



(51) МПК  
*G01N 33/574* (2006.01)  
*C12N 5/0783* (2010.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*G01N 33/574* (2020.08); *C12N 5/0634* (2020.08); *A61P 35/02* (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2017115413, 07.10.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 07.10.2015

Дата регистрации:  
 20.02.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
 08.04.2015 US 62/144,682;  
 08.10.2014 US 62/061,553

(43) Дата публикации заявки: 15.11.2018 Бюл. № 32

(45) Опубликовано: 20.02.2021 Бюл. № 5

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
 национальной фазе: 10.05.2017

(86) Заявка РСТ:  
 US 2015/054542 (07.10.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:  
 WO 2016/057705 (14.04.2016)

Адрес для переписки:  
 129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,  
 ООО "Юридическая фирма Городиский и  
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

**БЕДОЙА Фелипе (US),**  
**БИТТЕР Ханс (US),**  
**БРОГДОН Дженнифер (US),**  
**ДОРФМЕЙЕР Корин (US),**  
**ГАРГ Эбхишек (US),**  
**ГЛАСС Дэвид (US),**  
**МАННИК Джоан (US),**  
**МИЛЕНХОРСТ Ян Дж. (US),**  
**МАЙЛОН Майкл С. (US),**  
**МЕРФИ Леон (US),**  
**ОРЛАНДО Елена (US),**  
**УИЛКОКС Николас (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**НОВАРТИС АГ (CH),**  
**ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ**  
**ОФ ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)**

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: WO2014011984 A1, 16.01.2014.  
 WO2014039044 A1, 13.03.2014. Yang Xu et al.  
 Closely related T-memory stem cells correlate  
 with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and  
 are preserved by IL-7 and IL-15 // Blood. 2014 Jun  
 12; 123(24): 3750-3759.

(54) **БИОМАРКЕРЫ, ПРОГНОЗИРУЮЩИЕ СПОСОБНОСТЬ К ТЕРАПЕВТИЧЕСКОМУ ОТВЕТУ НА ТЕРАПИЮ ХИМЕРНЫМ РЕЦЕПТОРОМ АНТИГЕНА, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а именно к онкологии, и может быть использована для оценки или мониторинга эффективности терапии у индивидуума, имеющего гематологическую злокачественную опухоль. Способ оценки эффективности терапии CAR19-экспрессирующими клетками у индивидуума, имеющего гематологическую злокачественную опухоль, включает получение величины уровня CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток

в популяции CD8+ Т-клеток в образце, полученном от индивидуума, или в образце продукта, содержащего популяцию CAR19-экспрессирующих клеток. Более высокий процент CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток в CD8+ популяции по сравнению с числом CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток у не отвечающего индивидуума указывает на то, что индивидуум реагирует на терапию CAR19-экспрессирующими клетками. Группа

изобретений также относится к способу лечения гематологической злокачественной опухоли у индивидуума, включающему введение индивидууму продукта CAR19-экспрессирующих клеток, а также к способу оценки эффективности продукта CAR19-экспрессирующих клеток. Использование данной группы изобретений

позволяет оценить эффективность терапии CAR19-экспрессирующими клетками, где полная ремиссия у пациентов с CLL при иммунотерапии CART19 ассоциирована с более высокими количествами инфузируемых CD27+PD1- CART-клеток. 4 н. и 15 з.п. ф-лы, 23 ил., 24 табл., 7 пр.

R U 2 7 4 3 6 5 7 C 2

R U 2 7 4 3 6 5 7 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/574* (2006.01)  
*C12N 5/0783* (2010.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*G01N 33/574* (2020.08); *C12N 5/0634* (2020.08); *A61P 35/02* (2020.08)(21)(22) Application: **2017115413, 07.10.2015**(24) Effective date for property rights:  
**07.10.2015**Registration date:  
**20.02.2021**

Priority:

(30) Convention priority:  
**08.04.2015 US 62/144,682;**  
**08.10.2014 US 62/061,553**(43) Application published: **15.11.2018 Bull. № 32**(45) Date of publication: **20.02.2021 Bull. № 5**(85) Commencement of national phase: **10.05.2017**(86) PCT application:  
**US 2015/054542 (07.10.2015)**(87) PCT publication:  
**WO 2016/057705 (14.04.2016)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,**  
**OOO "Yuridicheskaya firma Gorodiskij i**  
**Partnery"**

(72) Inventor(s):

**BEDOYA Felipe (US),**  
**BITTER Hans (US),**  
**BROGDON Jennifer (US),**  
**DORFMEIER Corin (US),**  
**GARG Abhishek (US),**  
**GLASS David (US),**  
**MANNICK Joan (US),**  
**MELENHORST Jan J. (US),**  
**MILONE Michael C. (US),**  
**MURPHY Leon (US),**  
**ORLANDO Elena (US),**  
**WILCOX Nicholas (US)**

(73) Proprietor(s):

**NOVARTIS AG (CH),**  
**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF**  
**PENNSYLVANIA (US)**(54) **BIOMARKERS PREDICTING A THERAPEUTIC RESPONSE TO THERAPY WITH A CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR, AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; oncology.

SUBSTANCE: group of inventions can be used to assess or monitor the effectiveness of therapy in an individual having a hematologic malignant tumor. Method for assessing the clinical effectiveness of CAR19-expressing cells in an individual having a haematological malignant tumor, involves obtaining a CD27+ CD45RO- immune effector cell level in a population of CD8+ T-cells in a sample obtained from an individual, or in a sample of a product containing a population of CAR19-expressing cells. Higher

percentage of CD27+ CD45RO- immune effector cells in the CD8+ population compared to the number of CD27+ CD45RO- immune effector cells in the non-responding individual indicates that individual responds to therapy with CAR19-expressing cells. Group of inventions also relates to a method of treating a hematologic malignant tumor in an individual, comprising administering a CAR19-expressing cell product to an individual, as well as a method of evaluating the CAR19-expressing cell product efficiency.

EFFECT: use of this group of inventions enables evaluating the effectiveness of therapy with CAR19-expressing cells, where complete remission in CLL patients with CART19 immunotherapy is associated

with higher amounts of infused CD27+ PD1- CART cells.

19 cl, 23 dwg, 24 tbl, 7 ex

R U 2 7 4 3 6 5 7 C 2

R U 2 7 4 3 6 5 7 C 2



По настоящей заявке испрашивается приоритет заявке США с серийным номером № 62/061553, поданной 8 октября 2014 года, и заявке США с серийным номером № 62/144682, поданной 8 апреля 2015 года, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

## 5 СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который предоставлен в электронной форме в формате ASCII и, таким образом, включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Указанная копия ASCII, созданная 7 октября 2015 года, названа N2067-7057WO\_SL.txt и имеет размер 219221 байт.

## 10 ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к биомаркерам злокачественной опухоли и к их применению.  
**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОМУ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Многие пациенты с В-клеточными злокачественными опухолями не могут быть вылечены с использованием стандартной терапии. Кроме того, традиционные варианты  
15 лечения часто имеют серьезные побочные эффекты. Были предприняты попытки иммунотерапии злокачественной опухоли, однако некоторые препятствия делают ее клиническую эффективность труднодостижимой целью. Хотя были идентифицированы сотни так называемых опухолевых антигенов, они, как правило, являются собственными по происхождению и, таким образом, слабоиммуногенными. Более того, опухоли  
20 используют несколько механизмов, которые делают их противодействующими началу и усилению иммунной атаки.

Последние разработки с использованием терапии аутологичными модифицированными химерным рецептором антигена (CAR) Т-клетками (CART), которая основана на перенацеливании Т-клеток на подходящую молекулу клеточной  
25 поверхности на злокачественных клетках, таких как В-клеточные злокачественные опухоли, демонстрируют перспективные результаты в отношении приспособления сил иммунной системы к лечению В-клеточных новообразований и других злокачественных опухолей (см., например, Sadelain et al., Cancer Discovery 3:388-398 (2013)). Например, клинические результаты для CART19, которые связываются с CD19 (т.е. "CTL019"),  
30 показали перспективность в отношении установления полных ремиссий у пациентов, страдающих хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL), а также детским острым лимфоцитарным лейкозом (ALL) (см., например, Kalos et al., SCI TRANSL MED 3:95ra73 (2011), Porter et al., NEJM 365:725-733 (2011), Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)).

Помимо способности химерного рецептора антигена на генетически  
35 модифицированных Т-клетках распознавать и разрушать клетки-мишени, успешная терапия терапевтическими Т-клетками должна иметь возможность пролиферации, персистенции с течением времени и дальнейшего мониторинга ускользнувших лейкозных клеток. Изменчивое фенотипическое состояние Т-клеток, представляющее собой анергию, подавление или истощение, будет оказывать эффекты на эффективность  
40 трансформированных CAR Т-клеток. Чтобы быть эффективными, трансформированные CAR Т-клетки пациента должны персистировать и сохранять способность к пролиферации в ответ на антиген CAR.

Таким образом, существует потребность в способе применения биомаркеров для дифференциальной диагностики и лечения злокачественной опухоли с помощью терапии  
45 CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками). В частности, существует неудовлетворенная потребность в эффективных прогностических факторах терапевтического ответа у индивидуумов, имеющих гематологическую злокачественную опухоль, такую как CLL и ALL, на терапию CAR-экспрессирующими клетками,

например, CTL019 или другими клетками, экспрессирующими CAR против CD19.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к идентификации и применению анализируемых соединений, профилей анализируемых соединений или маркеров (например, профили экспрессии генов, проточной цитометрии и/или экспрессии белков), обладающих клинической значимостью при злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и острый лимфоцитарный лейкоз (ALL)). В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к идентификационной информации о генах, экспрессия которых на уровне транскрипции и на белковом уровне коррелирует с прогрессированием CLL и ALL, например, в качестве средства для прогнозирования ответа на терапию клетками, экспрессирующими химерный рецептор антигена (CAR) (например, терапию, включающую клетку (например, иммунную эффекторную клетку или популяцию клеток), которая экспрессирует CAR, который связывается с CD19 (также обозначаемая в настоящем описании как "CAR19" или клетка, экспрессирующая "CAR против CD19")). В определенных вариантах осуществления, оценивают один или несколько из сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, биомаркера, приведенного в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, биомаркера CD27, биомаркера CD45RO, биомаркера PD-1, биомаркера LAG-3, биомаркера TIM-3, биомаркера IL2RA, биомаркера IL21, биомаркера CD4, биомаркера CD8, сигнатуры набора генов TH1+ Т-хелперных клеток, сигнатуры набора генов TH2+ Т-хелперных клеток, сигнатуры набора генов Т-клеток памяти (например, CD8+ Т-клеток памяти, например, наивных Т-клеток (TN), например, стволовых клеток памяти (T<sub>SCM</sub>), например, центральных Т-клеток памяти (T<sub>CM</sub>), например эффекторных Т-клеток памяти (T<sub>EM</sub>)), и их комбинации. Эти профили экспрессии генов можно использовать для диагностики и/или прогнозирования злокачественной опухоли, например, гематологической злокачественной опухоли, такой как CLL и ALL, и они являются особенно пригодными для прогнозирования того, будет ли индивидуум, у которого диагностирована злокачественная опухоль, например, гематологическая злокачественная опухоль, такая как CLL или ALL, хорошо отвечать на терапию CAR (например, терапию CAR против CD19, как описано в настоящем описании, например, на терапию CTL019). По сравнению с клиническими параметрами или биохимическими маркерами, используемыми в существующих способах прогнозирования, профили экспрессии генов, описанных в настоящем описании, обеспечивают более надежные характерные признаки прогрессирования гематологической злокачественной опухоли (например, прогрессирования CLL и ALL) и обеспечивают более надежную несубъективную основу для выбора подходящих терапевтических режимов.

Среди прочего, настоящее изобретение относится к новым генным сигнатурам, например, на уровне транскрипции и на белковом уровне, которые прогнозируют ответ индивидуума на терапию клеткой, экспрессирующей CAR, например, CAR против CD19 (например, клеткой, экспрессирующей CAR против CD19, например, Т-клеткой, НК-клеткой, описанной в настоящем описании, например, такой как CTL019) при злокачественной опухоли, например, гематологической злокачественной опухоли, такой как CLL и ALL, и к способам их применения.

Настоящее изобретение демонстрирует, по меньшей мере частично, что профили экспрессии и генные сигнатуры, например, на уровне транскрипции и на белковом

уровне, являются пригодными для различения отвечающего индивидуума, частично отвечающего индивидуума, неответающего индивидуума, индивидуума, у которого возникнет рецидив, или индивидуума, у которого не возникнет рецидива, при терапии, включающей CAR-экспрессирующую клетку (например, CAR-экспрессирующую иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку или НК-клетку) (также обозначаемой в настоящем описании как "терапия CAR-экспрессирующими клетками"), злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как CLL и ALL). В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующая клетка представляет собой клетку, экспрессирующую CAR против CD19. В одном варианте осуществления терапия представляет собой терапию CTL019. В некоторых вариантах осуществления профили экспрессии и генные сигнатуры, описанные в настоящем описании, различают индивидуума, отвечающего на клетку, экспрессирующую CAR (или CAR против CD19), индивидуума, частично отвечающего на клетку, экспрессирующую CAR (или CAR против CD19), или индивидуума, не отвечающего на клетку, экспрессирующую CAR (или CAR против CD19) (например, индивидуума, отвечающего на CTL019, индивидуума, частично отвечающего на CTL019, и индивидуума, не отвечающего CTL019); или индивидуума, у которого возникнет рецидив при терапии клеткой, экспрессирующей CAR (или CAR против CD19), или индивидуума, у которого не возникнет рецидива при терапии клеткой, экспрессирующей CAR (или CAR против CD19) (например, индивидуума, у которого возникнет рецидив при терапии CTL019, или индивидуума, у которого не возникнет рецидива при терапии CTL019), при злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как CLL и ALL). Настоящее изобретение охватывает идентификацию новых генных сигнатур, прогнозирующих ответ у индивидуума на терапию CAR-экспрессирующими клетки, например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, такими как CTL019.

Таким образом, в рамках настоящего изобретения описаны способы, системы, композиции и наборы для идентификации, оценки и/или лечения индивидуума, имеющего злокачественную опухоль. Иллюстративные злокачественные опухоли включают, но не ограничиваются ими, В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (В-ALL), Т-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (Т-ALL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический миелогенный лейкоз (СМL), хронический лимфоцитарный лейкоз (СLЛ), В-клеточный промиелоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина (HL), плазмабластную лимфому, новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток и макроглобулинемию Вальденстрема. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль представляет собой ALL. В другом варианте осуществления злокачественная опухоль представляет собой CLL. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль ассоциирована с экспрессией CD19.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к способу оценки индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, например, гематологическую злокачественную опухоль. Способ включает получение величины статуса ответа или рецидива (например, величины статуса ответа или рецидива, как описано в настоящем

описании) при терапии, включающей CAR-экспрессирующую клетку (например, множество (например, популяцию) CAR (например, CAR19)-экспрессирующих клеток), для индивидуума, где указанная величина указывает на статус способности индивидуума к ответу или рецидиву при терапии CAR-экспрессирующими клетками.

5 В родственном аспекте изобретение относится к способу оценки или мониторинга эффективности терапии CAR-экспрессирующими клетками у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, например, гематологическую злокачественную опухоль. Способ включает получение величины статуса ответа или рецидива (например, величина  
10 статуса ответа или рецидива, как описано в настоящем описании) при терапии, включающей CAR-экспрессирующую клетку (например, множество (например, популяцию) CAR(например, CAR19)-экспрессирующих клеток), для индивидуума, где указанная величина указывает на эффективность терапии CAR-экспрессирующими клетками, тем самым, осуществляя оценку эффективности терапии CAR-экспрессирующими клетками у индивидуума.

15 В другом аспекте изобретение относится к способу лечения индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, например, гематологическую злокачественную опухоль. Способ включает введение индивидууму терапевтически эффективной дозы терапии CAR-экспрессирующими клетками, если индивидуум идентифицирован как отвечающий (например, идентифицирован как полностью отвечающий индивидуум, частично  
20 отвечающий индивидуум или индивидуум, у которого не возникнет рецидива) на терапию, включающую CAR-экспрессирующую клетку (например, множество (например, популяцию) CAR(например, CAR19)-экспрессирующих клеток), где указанная идентификация включает определение величины статуса ответа или рецидива (например, определение величины статуса ответа или рецидива, как описано в настоящем описании).

25 В родственном аспекте изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, например, гематологической злокачественной опухоли, у индивидуума. Способ включает получение величины статуса ответа или рецидива (например, величины статуса  
30 ответа или рецидива, как описано в настоящем описании) на терапию, включающую CAR-экспрессирующую клетку (например, множество (например, популяцию) CAR (например, CAR19)-экспрессирующих клеток), для индивидуума; и, после получения указанной величины, лечение злокачественной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, величина статуса ответа или рецидива  
35 включает один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или более (все) из следующих показателей:

- (i) уровень или активность CD27 и/или CD45RO- (например, CD27+ CD45RO-) иммунных эффекторных клеток, например, в популяции CD4+ или CD8+ Т-клеток, у индивидуума, например, в образце от индивидуума (например, образец, полученный посредством афереза, или образец продукта CAR-экспрессирующих клеток);
- 40 (ii) уровень или активность одного, двух, трех или более (например, всех) из покоящихся клеток T<sub>EFF</sub>, покоящихся клеток T<sub>REG</sub>, более молодых Т-клеток (например, более молодых CD4 или CD8 клеток, или гамма/дельта Т-клеток), или ранних Т-клеток памяти или их комбинации, у индивидуума, например, в образце от индивидуума (например, образец, полученный посредством афереза, или образец продукта CAR-  
45 экспрессирующих клеток);
- (iii) уровень или активность одного, двух, трех или более (например, всех) из активированных клеток T<sub>EFF</sub>, активированных клеток T<sub>REG</sub>, более старых Т-клеток (например, более старых CD4 или CD8 клеток), или поздних Т-клеток памяти или их

комбинации, у индивидуума, например, в образце от индивидуума (например, образец, полученный посредством афереза, или произведенный образец продукта CAR-экспрессирующих клеток);

5 (iv) уровень или активность маркера истощения иммунных клеток, например, одного, двух или нескольких ингибиторов иммунной точки контроля (например, PD-1, TIM-3 и/или LAG-3) у индивидуума, например, в образце от индивидуума (например, образец, полученный посредством афереза, или произведенный образец продукта CAR-экспрессирующих клеток);

10 (v) уровень или активность одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, двадцати или более из биомаркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 16, таблице 17, таблице 18, таблице 20, на фиг.2В, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1 или сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19;

15 (vi) уровень или активность цитокинов (например, качество набора цитокинов) в образце продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, в образце продукта CAR19-экспрессирующих клеток (например, CTL019), где цитокин выбран из одного, двух, трех, четырех, пяти или более (или всех) из цитокинов, приведенных в таблице 16;

20 (vii) эффективность трансдукции CAR-экспрессирующих клеток в образце продукта CAR-экспрессирующих клеток; или

(viii) количество CD27+ PD-1- клеток у индивидуума, например, в образце от индивидуума (например, образец, полученный посредством афереза, или образец продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, в образце продукта CAR19-экспрессирующих клеток (например, CTL019)), например, количество, превышающее  
25 или равное  $1 \times 10^7$  клеток.

В одном аспекте изобретение относится к терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, CART-клеткой против CD19, например, клеткой CTL019) для применения для лечения индивидуума, где CAR-экспрессирующие клетки анализируют способом, описанным в настоящем описании, например, до или после трансдукции или трансфекции  
30 нуклеиновой кислотой CAR. В родственном аспекте изобретение относится к терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, CART-клеткой против CD19, например, CTL019-клеткой), для применения для лечения индивидуума, который идентифицирован как отвечающий (например, идентифицирован как полностью отвечающий, частично отвечающий индивидуум или индивидуум, у которого не возникнет рецидива) на  
35 терапию, включающую популяцию CAR-экспрессирующих клеток (например, популяцию CAR19-экспрессирующих клеток). Композиция для применения может обеспечивать один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или более (все) из (i)-(viii) измеренных показателей, описанных в настоящем описании.

40 Альтернативно или в комбинации со способами и композициями для применения, описанными в настоящем описании, после определения указанной величины проводят одно, два, три, четыре, пять, шесть, семь или более (например, все) из:

идентификации индивидуума как полностью отвечающего, частично отвечающего или не отвечающего индивидуума, или индивидуума, у которого возникнет рецидив, или индивидуума, у которого не возникнет рецидива;

45 проведения, например, у отвечающего индивидуума или индивидуума, у которого не возникнет рецидива, терапии CAR-экспрессирующими клетками;

проведения измененного дозирования терапии CAR-экспрессирующими клетками; изменения схемы или длительности терапии CAR-экспрессирующими клетками;

введения, например, не отвечающему индивидууму или частично отвечающему индивидууму, дополнительного средства в комбинации с терапией CAR-экспрессирующими клетками, например, ингибитора точки контроля, например, ингибитора точки контроля, описанного в настоящем описании;

5 проведения у не отвечающего индивидуума или частично отвечающего индивидуума терапии, которая увеличивает количество более молодых Т-клеток у индивидуума, перед проведением терапии CAR-экспрессирующими клетками;

модификации процесса терапии, например, процесса производства CAR-экспрессирующих клеток, например, увеличения содержания более молодых Т-клеток перед введением нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, или увеличение эффективности трансдукции, например, для индивидуума, идентифицированного как не отвечающий индивидуум или частично отвечающий индивидуум;

10 проведения альтернативной терапии, например, для не отвечающего индивидуума, или частично отвечающего индивидуума, или индивидуума, у которого возникнет рецидив, например, стандартной терапии конкретного типа злокачественной опухоли; или

если индивидуум представляет собой или идентифицирован как не отвечающий индивидуум или индивидуум, у которого возникнет рецидив, снижения популяции клеток T<sub>REG</sub> и/или показателей генной сигнатуры T<sub>REG</sub>, например, посредством одного или 20 нескольких из истощения CD25 или введения циклофосфида, антитела против GITR, ингибитора mTOR или их комбинации.

В определенных вариантах осуществления индивидуума предварительно лечат антителом против GITR. В определенном варианте осуществления индивидуума лечат антителом против GITR перед инфузией или реинфузией.

25 В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой пациента с CLL.

В другом аспекте изобретение относится к способу или анализу для идентификации индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, как имеющего увеличенную или 30 уменьшенную вероятность ответа на лечение, которое включает CAR-экспрессирующую клетку (например, множество (например, популяцию) CAR(например, CAR19)-экспрессирующих клеток). Способ включает:

(1) предоставление, например, получение, образца от индивидуума;

(2) определение уровня или активности одного или нескольких из биомаркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, 35 таблице 10, таблице 14 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1 в образце;

где различие, например, статистически значимое различие, между определенным уровнем по сравнению с эталонным уровнем прогнозирует способность индивидуума отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками; и

40 (3) (необязательно) идентификацию индивидуума как полностью отвечающего индивидуума, частично отвечающего индивидуума, не отвечающего индивидуума, индивидуума, у которого возникнет рецидив, или индивидуума, у которого не возникнет рецидива, на терапию CAR-экспрессирующими клетками.

В другом аспекте, изобретение относится к способу лечения индивидуума, имеющего 45 злокачественную опухоль, включающему:

определение того, имеет ли индивидуум увеличенную вероятность ответа или уменьшенную вероятность рецидива при терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, терапия CAR19-экспрессирующими клетками, например, CTL019) путем

определения уровня или активности одного или нескольких из биомаркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), на фиг.2В, в таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1, или

5 сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, в образце индивидуума, например, относительно эталонного уровня; и

введение индивидууму терапевтически эффективной дозы терапии CAR-экспрессирующими клетками.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения индивидуума, имеющего

10 злокачественную опухоль, включающему:

(1) определение того, имеет ли индивидуум увеличенную вероятность рецидива при терапии CAR-экспрессирующими клетками, путем получения величины уровня или активности одного или нескольких маркеров, приведенных в таблицах настоящего описания, например, в таблице 17, в образце от индивидуума (например, образец,

15 полученный посредством афереза, или произведенный образец CAR-экспрессирующего продукта), где отличие, например, статистически значимое отличие, уровня или активности одного или нескольких биомаркерных генов относительно эталонной величины указывает на увеличенную вероятность рецидива при терапии CAR-экспрессирующими клетками; и

(2) для индивидуума с увеличенной вероятностью рецидива, снижение популяции клеток T<sub>REG</sub> и/или показателей генной сигнатуры T<sub>REG</sub>; и

(3) введение индивидууму терапевтически эффективной дозы терапии CAR-экспрессирующими клетками.

Дополнительные признаки и варианты осуществления настоящего изобретения

25 включают одно или несколько из следующих.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, иммунная клетка имеет фенотип истощения, например, совместно экспрессирует по меньшей мере два маркера истощения, например, совместно экспрессирует PD-1 и TIM-3. В других вариантах осуществления

30 иммунная клетка имеет фенотип истощения, например, совместно экспрессирует по меньшей мере два маркера истощения, например, совместно экспрессирует PD-1 и LAG-3.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов, систем, композиций для применения и наборов, описанных в настоящем описании терапия CAR-

35 экспрессирующими клетками включает множество (например, популяцию) CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток, например, множество (например, популяцию) Т-клеток или NK-клеток, или их комбинацию. В одном варианте осуществления терапия CAR-экспрессирующими клетками представляет собой терапию CAR19 (например, терапию CTL019). В одном варианте осуществления терапия CAR-

40 экспрессирующими клетками включает или состоит из CTL019. В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующая клетка представляет собой продукт CTL019. В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующая клетка представляет собой Т-клетку. В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующая клетка представляет собой NK-клетку.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, один или несколько показателей из (i) -(viii) получают для образца индивидуума, полученного посредством афереза. Образец, полученный посредством афереза, можно оценивать до инфузии или реинфузии.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, один или несколько из показателей (i)-(viii) получают для образца произведенного продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, образца продукта CAR19-экспрессирующих клеток (например, CTL019).

5 Произведенный продукт CAR-экспрессирующих клеток можно оценивать до инфузии или реинфузии.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, индивидуума оценивают до, в процессе или после проведения терапии CAR-экспрессирующими клетками.

10 В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, гематологическая злокачественная опухоль представляет собой ALL или CLL. Индивидуум может представлять собой пациента-человека.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, клетку, например, популяцию иммунных эффекторных клеток (например, клетки, экспрессирующие молекулу CAR, описанную в настоящем описании) вводят в комбинации с ингибитором молекулы иммунной точки контроля, выбранным из одного или нескольких из PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, 15 TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAL9, аденозина, TGFR (например, TGFR-бета) или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, индивидууму проводят сопутствующее 25 лечение средством, например, ингибитором mTOR и/или ингибитором точки контроля. В некоторых вариантах осуществления индивидууму проводят лечение средством, например, ингибитором mTOR и/или ингибитором точки контроля, после терапии CAR-экспрессирующими клетками. В некоторых вариантах осуществления индивидууму проводят предварительное лечение средством, например, ингибитором mTOR и/или 30 ингибитором точки контроля, до начала терапии CAR-экспрессирующими клетками.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, популяцию клеток T<sub>REG</sub> и/или показатели генной сигнатуры T<sub>REG</sub> снижают до сбора клеток для производства. В некоторых 35 вариантах осуществления популяцию клеток T<sub>REG</sub> и/или показатели генной сигнатуры T<sub>REG</sub> снижают до терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, T-клетками, НК-клетками). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток T<sub>REG</sub> и/или показатели генной сигнатуры T<sub>REG</sub> снижают посредством введения циклофосфида, антитела против GITR, ингибитора mTOR или их комбинации.

40 В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, величина статуса ответа или рецидива включает показатель комбинации генной сигнатуры и биомаркера. В некоторых вариантах осуществления величина статуса ответа или рецидива включает показатель сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, и комбинации 45 одного или нескольких из: биомаркера, приведенного в таблице 1A, таблице 1B, таблице 7A, таблице 7B, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14 (например, CCL20, IL-17a и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L или KLRG1.



В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, способ дополнительно включает идентификацию индивидуума как отвечающего (например, полностью отвечающего или частично отвечающего) индивидуума, не отвечающего индивидуума, индивидуума, у которого возникнет рецидив, или индивидуума, у которого не возникнет рецидива, на основании одного или нескольких из (i)-(viii).

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, один или несколько показателей из (i)-(viii) оценивает один или несколько из профилей экспрессии генов, проточной цитометрии или экспрессии белка.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, профиль экспрессии включает одну или несколько генных сигнатур на основе уровней экспрессии мРНК выбранных генов, полученной из образца, полученного посредством афереза, или образца произведенного продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, CTL019). В одном варианте осуществления профиль экспрессии включает один, два, три, четыре, пять, десять, двадцать или более биомаркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 16, таблице 17, таблице 18, таблице 20, на фиг.2В, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1, или сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, уровень или активность CD8+ Т-клеток оценивают с использованием профиля или сигнатуры, указывающих на процент CD8+ Т-клеток в образце.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, уровень или активность CD27+ CD45RO-иммунных эффекторных клеток оценивают с использованием профиля или сигнатуры, указывающих на процент CD27+ CD45RO-иммунных эффекторных клеток в образце.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, уровень или активность, например, в (i), (ii) или (v), оценивают с использованием профиля или генной сигнатуры согласно одному, двум, трем, четырем, пяти, десяти, двадцати, пятидесяти, шестидесяти, семидесяти, ста или более биомаркеров или наборов генов, приведенных в таблицах 1А, 1В, 3, 4, 5, 6 или на фиг.2В.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, уровень или активность одного, двух или более ингибиторов иммунной точки контроля оценивают, например, с использованием проточной цитометрии, в качестве индикатора процента PD-1+/LAG-3+ клеток в популяции CAR-экспрессирующих клеток (например, популяции CAR19+ клеток).

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, уровень или активность одного, двух или более ингибиторов иммунной точки контроля оценивают, например, с использованием проточной цитометрии, в качестве индикатора процента PD-1+/TIM-3+ клеток в популяции CAR-экспрессирующих клеток (например, популяции CAR19+ клеток).

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для

применения, описанных в настоящем описании, уровень или активность одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, двадцати, пятидесяти, шестидесяти, семидесяти ста или более биомаркеров или наборов генов, приведенных в таблице 7А, таблице 7В, таблице 8 и на фиг.2В, прогнозируют ответ индивидуума на продукт CAR19+ клеток (например, 5 CTL019).

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, величина статуса ответа или рецидива включает показатель уровня или активности одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, двадцати или более (например, всех) биомаркеров, имеющих данное значение  $p$  FDR, 10 приведенных в настоящем описании, например, в таблице настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления значение  $p$  FDR составляет менее 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01, 0,005, 0,002 или 0,001. В некоторых вариантах осуществления значение  $p$  FDR составляет менее 0,1 или 0,01. В некоторых вариантах осуществления биомаркеры представляют собой биомаркеры, приведенные в таблице 1А, таблице 1В, таблице 16, 15 таблице 17, таблице 18 или таблице 20, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления показатель включает показатель для всех биомаркеров, приведенных в таблице 1А, которые имеют значение  $p$  ниже порогового уровня 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01, 0,005, 0,002 или 0,001. В некоторых вариантах осуществления показатель включает показатель для всех биомаркеров, приведенных в таблице 1В, которые имеют значение 20  $p$  ниже порогового уровня 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01, 0,005, 0,002 или 0,001. В некоторых вариантах осуществления показатель включает показатель для всех биомаркеров, приведенных в таблице 16, которые имеют значение  $p$  ниже порогового уровня 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01, 0,005, 0,002 или 0,001. В некоторых вариантах осуществления показатель включает показатель для всех биомаркеров, приведенных в таблице 17, которые имеют 25 значение  $p$  ниже порогового уровня 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01, 0,005, 0,002 или 0,001. В некоторых вариантах осуществления показатель включает показатель для всех биомаркеров, приведенных в таблице 18, которые имеют значение  $p$  ниже порогового уровня 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01, 0,005, 0,002 или 0,001. В некоторых вариантах осуществления показатель включает показатель для всех биомаркеров, приведенных 30 в таблице 20, которые имеют значение  $p$  ниже порогового уровня 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01, 0,005, 0,002 или 0,001. В некоторых вариантах осуществления показатель включает показатель для всех биомаркеров, имеющих значение  $p$  ниже порогового уровня. В некоторых вариантах осуществления показатель включает показатель для одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, двадцати, пятидесяти или ста биомаркеров, имеющих 35 значение  $p$  ниже порогового уровня. В некоторых вариантах осуществления показатель включает показатель по меньшей мере для одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, двадцати, пятидесяти или ста биомаркеров, имеющих значение  $p$  ниже порогового уровня. В некоторых вариантах осуществления показатель включает показатель для 1-5, 5-10, 10-20, 20-50 или 50-100 биомаркеров, имеющих значение  $p$  ниже порогового 40 уровня.

В некоторых вариантах осуществления биомаркеры, приведенные в таблице 7В, которые обозначены как "CR" в таблице, активированы у полностью отвечающих индивидуумов по сравнению с не отвечающими индивидуумами. В некоторых вариантах осуществления биомаркеры, приведенные в таблице 7В, которые обозначены как "NR" 45 в таблице, активированы у не отвечающих индивидуумов по сравнению с полностью отвечающими индивидуумами.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, биомаркер представляет собой

секретируемый биомаркер или биомаркер клеточной поверхности, приведенный в таблице 8. Например, количественное определение биомаркера можно проводить посредством проточной цитометрии.

5 В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, отвечающий индивидуум (например, полностью отвечающий индивидуум) имеет или идентифицирован как имеющий более высокий уровень или активность одного, двух или более (всех) из GZMK, PPF1BP2 или наивных Т-клеток по сравнению с не отвечающим индивидуумом.

10 В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, не отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий, более высокий уровень или активность одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи или более (например, всех) из IL22, IL-2RA, IL-21, IRF8, IL8, CCL17, CCL22, эффекторных Т-клеток или регуляторных Т-клеток, по сравнению с отвечающим индивидуумом.

15 В одном варианте осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, индивидуум, у которого возникнет рецидив, представляет собой пациента, имеющего или идентифицированного как имеющий увеличенный уровень экспрессии одного или нескольких (например, 2, 3, 4 или всех из) следующих генов по сравнению с индивидуумами, у которых не возникнет рецидива:  
 20 MIR199A1, MIR1203, uc021ovr, ITM2C и HLA-DQB1, и/или сниженный уровень экспрессии одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или всех) из следующих генов по сравнению с индивидуумами, у которых не возникнет рецидива: PPIAL4D, TTTY10, TXLNG2P, MIR4650-1, KDM5D, USP9Y, PRKY, RPS4Y2, RPS4Y1, NCRNA00185, SULT1E1 и EIF1AY.

25 В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, полностью отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий, например, более высокий на статистически значимом уровне, процент CD8+ Т-клеток по сравнению с эталонной величиной, например, процентом CD8+ Т-клеток у не отвечающих индивидуумов.

30 В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, полностью отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент (например, 5%, 6%, 7%, 10%, 15%, 20%, 25%, 27%, 30%, 35%, или 40% или более) CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток, например, в популяции CD8+, по сравнению с эталонной  
 35 величиной, например, количеством CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток у не отвечающего индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, полностью отвечающий индивидуум или частично отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более  
 40 высокий, например, более высокий на статистически значимом уровне, процент CD4+ Т-клеток по сравнению с эталонной величиной, например, процентом CD4+ Т-клеток у не отвечающего индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, полностью отвечающий индивидуум  
 45 имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент одного, двух, трех или более (например, всех) из покоящихся клеток T<sub>EFF</sub>, покоящихся клеток T<sub>REG</sub>, более молодых Т-клеток (например, более молодых CD4 или CD8-клеток, или гамма/дельта Т-клеток), или ранних Т-клеток памяти или их комбинации, по сравнению с эталонной

величиной, например, количеством покоящихся клеток T<sub>EFF</sub>, покоящихся клеток T<sub>REG</sub>, более молодых Т-клеток (например, более молодых CD4 или CD8 клеток) или ранних Т-клеток памяти, у не отвечающего индивидуума.

5 В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, не отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент одного, двух, трех или более (например, всех) из активированных клеток T<sub>EFF</sub>, активированных клеток T<sub>REG</sub>, более старых Т-клеток (например, более старых CD4 или CD8 клеток), или поздних Т-клеток памяти или их комбинации, по сравнению с эталонной величиной, например, 10 количеством активированных клеток T<sub>EFF</sub>, активированных клеток T<sub>REG</sub>, более старых Т-клеток (например, более старых CD4 или CD8 клеток), или поздних Т-клеток памяти, у отвечающего индивидуума.

15 В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, не отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент маркера истощения иммунных клеток, например, одного, двух или нескольких ингибиторов иммунной точки контроля (например, PD-1, TIM-3 и/или LAG-3). В одном варианте осуществления не отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент 20 экспрессирующих PD-1 или LAG-3 иммунных эффекторных клеток (например, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток) (например, CAR-экспрессирующих CD4+ клеток и/или CD8+ Т-клеток) по сравнению с процентом экспрессирующих PD-1 или LAG-3 иммунных эффекторных клеток у отвечающего индивидуума.

25 В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, не отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент иммунных клеток, имеющих фенотип истощения, например, иммунных клеток, которые коэкспрессируют по меньшей мере два маркера истощения, например, коэкспрессируют PD-1 и TIM-3. В других вариантах осуществления не отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как 30 имеющий более высокий процент иммунных клеток, имеющих фенотип истощения, например, иммунных клеток, которые совместно экспрессируют по меньшей мере два маркера истощения, например, совместно экспрессируют PD-1 и LAG-3.

35 В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, не отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент PD-1+/LAG-3+ клеток в популяции CAR-экспрессирующих клеток (например, популяции CAR19+ клеток) по сравнению с отвечающим индивидуумом (например, полностью отвечающим индивидуумом) при терапии CAR-экспрессирующими клетками.

40 В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, частично отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент PD-1+/LAG-3+ клеток, чем отвечающий индивидуум, в популяции CAR-экспрессирующих клеток (например, в популяции CAR19+ клеток).

45 В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, не отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий фенотип истощения PD1+ CAR+ и коэкспрессию LAG3 в популяции CAR-экспрессирующих клеток (например, популяции CAR19+ клеток).

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для

применения, описанных в настоящем описании, не отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент PD-1+/TIM-3+ клеток в популяции CAR-экспрессирующих клеток (например, популяции CAR19+ клеток) по сравнению с отвечающим индивидуумом (например, полностью отвечающим индивидуумом).

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, частично отвечающие индивидуумы имеют или идентифицированы как имеющие более высокий процент PD-1+/TIM-3+ клеток, чем отвечающие индивидуумы, в популяции CAR-экспрессирующих клеток (например, в популяции CAR19+ клеток).

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, присутствие CD8+ CD27+ CD45RO- T-клеток в образце, полученном посредством афереза, является положительным прогностическим фактором для ответа индивидуума на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, терапию CAR19 (например, терапию CTL019)).

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, высокий процент PD1+ CAR+ и LAG3+ или TIM3+ T-клеток в образце, полученном посредством афереза, является фактором плохого прогноза для ответа индивидуума на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, терапию CAR19 (например, терапию CTL019)).

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, отвечающий индивидуум (например, полностью отвечающий индивидуум) на терапию CAR19 имеет или идентифицирован как имеющий профиль биомаркеров, приведенный в таблице 9.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, не отвечающий индивидуум на терапию CAR19 имеет или идентифицирован как имеющий биомаркер, включающий один или несколько из PD-1+ иммунных эффекторных клеток, TIM-3+ иммунных эффекторных клеток, LAG-3+ иммунных эффекторных клеток, KLRG1+ иммунных эффекторных клеток, CD27-иммунных эффекторных клеток, активированных клеток T<sub>EFF</sub>, активированных клеток T<sub>REG</sub>, активированных TH1, активированных TH2, стимулированных клеток памяти или поздних T-клеток памяти, или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, не отвечающий индивидуум на терапию CAR19 имеет или идентифицирован как имеющий профиль биомаркеров, приведенный в таблице 10.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, экспрессия одного, двух, трех, четырех или более (всех) из KLRG1, CD57, CD27, CD122 или CD62L является прогностическим фактором ответа пациента на терапию CTL019.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, индивидуум, у которого не возникнет рецидива, представляет собой пациента с B-ALL, и он имеет или идентифицирован как имеющий один или несколько профилей экспрессии (например, профилей экспрессии белков или генов) или генных сигнатур, характерных для покоящихся клеток T<sub>EFF</sub> или покоящихся клеток T<sub>REG</sub>.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для

применения, описанных в настоящем описании, пациент, у которого возникнет рецидив, представляет собой пациента с B-ALL, и он имеет или идентифицирован как имеющий один или несколько профилей экспрессии (например, профилей экспрессии белков или генов) или генных сигнатур, характерных для активированных клеток T<sub>EFF</sub> или активированных клеток T<sub>REG</sub>.

В некоторых вариантах осуществления любых из вышеуказанных способов и композиций для применения, клетка T<sub>REG</sub> (например, активированная клетка T<sub>REG</sub>) имеет повышенную экспрессию одного или нескольких (например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или всех) из следующих биомаркеров: AIM2, ALAS1, BATF, C5orf32, CCL17, CD40LG, CHAC2, CSF1, CTSL1, EBNA1BP2, EDARADD, EMP1, EPAS1, FABP5, FAM40B, FKBP4, FOSL1, GCLM, GK, GPR56, HMOX1, HSPD1, HSPE1, IKBP1, IL10, IL13, IL15RA, IL1RN, IL2RA, IL3, IL4, IL5, IL9, KCNK5, LTA, MANF, MIR1182, MIR155, MIR155HG, MYOF, NDUFAF1, NLN, NME1, NME1-NME2, PANX2, PDIA6, PGAM4, PPIL1, PPPDE2, PRDX4, PRKAR1B, PSMD1, PSMD11, PUS7, RBBP8, SLC27A2, SLC39A14, SLC43A3, SRXN1, STIP1, STT3A, TBX21, TNFRSF11A, TNFRSF1B, TNFRSF8, TNFRSF9, TXN, UCK2, VDR, VTRNA1-3, WDR12, YWHAG, ZDHHC16 или ZNF282. Повышенную экспрессию можно измерять, например, через 16 часов после стимуляции. Повышенную экспрессию можно определять, например, путем измерения уровней РНК указанных генов.

В некоторых вариантах осуществления любых из вышеупомянутых способов и композиций для применения, клетка T<sub>EFF</sub> (например, активированная клетка T<sub>EFF</sub>) имеет повышенную экспрессию одного или нескольких (например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или всех) из следующих биомаркеров: AIM2, ALAS1, B4GALT5, BATF, C3orf26, C4orf43, CCL3, CCL4, CCT3, CCT7, CD40LG, CHAC2, CSF2, CTNNA1, EBNA1BP2, EDARADD, EEF1E1, EIF2B3, EIF2S1, FABP5, FAM40B, FKBP4, FOSL1, GFOD1, GLRX2, HSPD1, HSPE1, IFNG, IL15RA, IL21, IL2RA, IL3, KCNK5, KIAA0020, LARP4, LRP8, LTA, MANF, MIR1182, MIR155, MIR155HG, MTCH2, MYOF, NDUFAF1, NLN, NME1, NME1-NME2, OTUD7B, PAM, PDIA6, PEA15, PFKM, PGAM1, PGAM4, PPIL1, PRDX4, PRSS23, PSMD1, PSMD11, PSMD14, PTRH2, PUS7, RBBP8, RPF2, RPP25, SFXN1, SLC27A2, SLC39A14, SLC43A3, SORD, SPR, SRXN1, STIP1, STT3A, TBX21, TMCC2, TMMEM165, TNFRSF9, TXN, TXNDC5, UCK2, VDR, WDR12, YWHAG или ZDHHC16. Повышенную экспрессию можно измерять, например, через 16 часов после стимуляции. Повышенную экспрессию можно определять, например, путем измерения уровней РНК указанных генов.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, индивидуум, у которого возникнет рецидив, представляет собой пациента с B-ALL, и он имеет или идентифицирован как имеющий один или несколько профилей экспрессии белков или генов, включающих один, два, три, четыре, пять, десять или более генов согласно таблице 7А, таблице 7В или фиг.2В или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, индивидуум, у которого возникнет рецидив, имеет или идентифицирован как имеющий повышенный уровень одного или нескольких биомаркеров клеток T<sub>REG</sub> или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, у которого возникнет рецидив, имеет или идентифицирован как имеющий повышенную экспрессию одного или нескольких (например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или всех) из следующих генов: AIM2, AFAS1, BATF, C5orf32,

CCL17, CD40LG, CHAC2, CSF1, CTSL1, EBNA1BP2, EDARADD, EMP1, EPAS1, FABP5, FAM40B, FKBP4, FOSL1, GCLM, GK, GPR56, HMOX1, HSPD1, HSPE1, IKBIP, IL10, IL13, IL15RA, IL1RN, IL2RA, IL3, IL4, IL5, IL9, KCNK5, LTA, MANF, MIR1182, MIR155, MIR155HG, MYOF, NDUFAF1, NLN, NME1, NME1-NME2, PANX2, PDIA6, PGAM4, PPIL1, PPPDE2, PRDX4, PRKAR1B, PSMD1, PSMD11, PUS7, RBBP8, SLC27A2, SLC39A14, SLC43A3, SRXN1, STIP1, STT3A, TBX21, TNFRSF11A, TNFRSF1B, TNFRSF8, TNFRSF9, TXN, UCK2, VDR, VTRNA1-3, WDR12, YWHAG, ZDHHC16 или ZNF282. В определенном варианте осуществления индивидуум, у которого возникнет рецидив, имеет или идентифицирован как имеющий повышенную экспрессию одного или нескольких (например, по меньшей мере 10, 20, 25 или всех) из следующих генов: C5orf32, CCL17, CSF1, CTSL1, EMP1, EPAS1, GCLM, GK, GPR56, HMOX1, IKBIP, IL10, IL13, IL1RN, IL4, IL5, IL9, MIR155, PANX2, PGAM4, PRKAR1B, TNFRSF11A, TNFRSF1B, TNFRSF8, VTRNA1-3 или ZNF282. Повышенную экспрессию можно измерять, например, через 16 часов после стимуляции. Повышенную экспрессию можно определять, например, путем измерения уровня РНК указанных генов.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий повышенный уровень одного или нескольких биомаркеров клеток T<sub>EFF</sub> или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий повышенную экспрессию одного или нескольких (например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или всех) из следующих генов: AIM2, ALAS1, B4GALT5, BATF, C3orf26, C4orf43, CCL3, CCL4, CCT3, CCT7, CD40LG, CHAC2, CSF2, CTNNA1, EBNA1BP2, EDARADD, EEF1E1, EIF2B3, EIF2S1, FABP5, FAM40B, FKBP4, FOSL1, GFOD1, GLRX2, HSPD1, HSPE1, IFNG, IL15RA, IL21, IL2RA, IL3, KCNK5, KIAA0020, LARP4, LRP8, LTA, MANF, MIR1182, MIR155, MIR155HG, MTCH2, MYOF, NDUFAF1, NLN, NME1, NME1-NME2, OTUD7B, PAM, PDIA6, PEA15, PFKM, PGAM1, PGAM4, PPIL1, PRDX4, PRSS23, PSMD1, PSMD11, PSMD14, PTRH2, PUS7, RBBP8, RPF2, RPP25, SFXN1, SLC27A2, SLC39A14, SLC43A3, SORD, SPR, SRXN1, STIP1, STT3A, TBX21, TMCC2, TMEM165, TNFRSF9, TXN, TXNDC5, UCK2, VDR, WDR12, YWHAG или ZDHHC16. В определенном варианте осуществления индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий повышенную экспрессию одного или нескольких (например, по меньшей мере 10, 20, 25 или всех) из следующих генов: B4GALT5, C3orf26, C4orf43, CCL3, CCL4, CCT3, CCT7, CSF2, CTNNA1, EEF1E1, EIF2B3, EIF2S1, GFOD1, GLRX2, IL21, IL2RA, IL3, KIAA0020, LARP4, LRP8, OTUD7B, PAM, PEA15, PFKM, PGAM1, PGAM4, PRSS23, PSMD1, PSMD11, PSMD14, PTRH2, RPF2, SORD, SPR, TMCC2, TMEM165 или TXNDC5. Повышенную экспрессию можно измерять, например, через 16 часов после стимуляции. Повышенную экспрессию можно определять, например, путем измерения уровней РНК указанных генов.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, отвечающий индивидуум (например, полностью или частично отвечающий индивидуум) имеет один, два, три или более (или все) из следующих профилей:

- (i) имеет увеличенное количество CD27+ иммунных эффекторных клеток по сравнению с эталонной величиной, например, количеством CD27+ иммунных эффекторных клеток у не отвечающего индивидуума;
- (ii) имеет большее количество CD8+ Т-клеток по сравнению с эталонной величиной, например, количеством CD8+ Т-клеток у не отвечающего индивидуума;
- (iii) имеет более низкое количество иммунных клеток, экспрессирующих один или

несколько ингибиторов точки контроля, например, ингибиторов точки контроля, выбранных из PD-1, LAG-3, TIM-3 или KLRG-1, или их комбинации, по сравнению с эталонной величиной, например, количеством клеток, экспрессирующих один или несколько ингибиторов точки контроля, у не отвечающего индивидуума; или

5 (iv) имеет более высокое количество одной, двух, трех, четырех или более (всех) из покоящихся клеток  $T_{EFF}$ , покоящихся клеток  $T_{REG}$ , более молодых клеток, наивных клеток CD4, нестимулированных клеток памяти или ранних Т-клеток памяти, или их комбинации, по сравнению с эталонной величиной, например, количеством покоящихся клеток  $T_{EFF}$ , покоящихся клеток  $T_{REG}$ , более молодых клеток, наивных клеток CD4,  
10 нестимулированных клеток памяти или ранних Т-клеток памяти, у не отвечающих индивидуумов.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, уровень или активность цитокинов, например, согласно (vi), выбраны из уровня или активности одного, двух, трех, четырех,  
15 пяти, шести, семи, восьми или более (или всех) из цитокинов CCL20/MIP3a, IL17A, IL6, GM-CSF, IFN  $\gamma$ , IL10, IL13, IL2, IL21, IL4, IL5, IL9 или TNF $\alpha$ , или их комбинации. Цитокин может быть выбран из одного, двух, трех, четырех или более (всех) из IL-17a, CCL20, IL2, IL6 или TNF $\alpha$ . В одном варианте осуществления увеличенный уровень или  
20 активность цитокинов, выбранных из одного или обоих из IL-17a и CCL20, указывает на увеличенную способность к ответу или сниженную способность к рецидиву. В некоторых вариантах осуществления уровень цитокинов измеряют после активации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, эффективность трансдукции 15% или выше, например, согласно (vii), указывает на увеличенную способность к ответу или  
25 сниженную способность к рецидиву.

В некоторых вариантах осуществления любых из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, эффективность трансдукции менее 15%, например, согласно (vii), указывает на сниженную способность к ответу или увеличенную  
30 способность к рецидиву.

В другом аспекте изобретение относится к способу идентификации индивидуума, который вероятно будет отвечать (например, полностью отвечающего индивидуума или частично отвечающего индивидуума, индивидуума, у которого не возникнет  
35 рецидива) на терапию, включающую CAR-экспрессирующие клетки (например, Т-клетки, НК-клетки) (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, например, описанными в настоящем описании, например, терапию CTL019). В одном варианте осуществления статус ответа (например, полностью отвечающий индивидуум, частично отвечающий индивидуум, не отвечающий индивидуум, индивидуум, у которого  
40 возникнет рецидив, или индивидуум, у которого не возникнет рецидива, на терапию, включающую CAR-экспрессирующие клетки (например, Т-клетки, НК-клетки)) определяют путем измерения одного или нескольких из сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, биомаркера, приведенного в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15,  
45 таблице 16 (например, CCL20, IL-17a и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, биомаркера CD27, биомаркера CD45RO, биомаркера PD-1, биомаркера LAG-3, биомаркера TIM-3, биомаркера IL2RA, биомаркера IL21, биомаркера CD4, биомаркера CD8, сигнатуры набора генов TH1+ Т-хелперных клеток, сигнатуры набора генов TH2+ Т-хелперных клеток, сигнатуры набора генов Т-клеток памяти (например, CD8+ Т-



клеток памяти, например, наивных Т-клеток ( $T_N$ ), например, стволовых клеток памяти ( $T_{SCM}$ ), например, центральных Т-клеток памяти ( $T_{CM}$ ) например, эффекторных Т-клеток памяти ( $T_{EM}$ )), и их комбинаций. В одном варианте осуществления полностью отвечающий индивидуум (CR) имеет, например, два, три, четыре или более (например, все) из  $CD27^+$ ,  $CD45RO^-$ ,  $PD-1^-$ ,  $LAG-3^-$  и  $TIM-3^-$ , как описано в таблице 9. В одном варианте осуществления не отвечающий индивидуум (NR) имеет, например, два, три или более (например, все) из  $CD27^-$ ,  $CD45RO^+$ ,  $PD-1^+$ ,  $LAG-3^+$  и  $TIM-3^+$ , как описано в таблице 10.

В одном варианте осуществления статус ответа или рецидива (например, полностью отвечающий индивидуум, частично отвечающий индивидуум, не отвечающий индивидуум, индивидуум, у которого возникнет рецидив, или индивидуум, у которого не возникнет рецидива при терапии CAR-экспрессирующими клетками) определяют путем оценки, например, измерения, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, пятнадцати или более из сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, биомаркера, приведенного в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1.

В одном варианте осуществления любые из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, можно использовать до проведения терапии CAR-экспрессирующими клетками. В некоторых вариантах осуществления описанные способы можно использовать до, одновременно или в процессе терапии CAR-экспрессирующими клетками.

В одном варианте осуществления любые из способов и композиций для применения, описанных в настоящем описании, можно использовать для идентификации индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, например, гематологическую злокачественную опухоль, например, такую как CLL или ALL, как имеющего увеличенную или сниженную вероятность ответа на лечение, которое включает терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19. Способ включает: (1) получение образца от индивидуума (например, образца, полученного посредством афереза крови индивидуума; и/или например, образца произведенного продукта, например, модифицированных способами генной инженерии Т-клеток); (2) определение уровня (например, величины или активности) одного или нескольких биомаркеров (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более), приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1 в образце; и (3) (необязательно) сравнение определенного уровня одного или нескольких биомаркеров с эталонным уровнем; и (4) идентификацию индивидуума как полностью отвечающего индивидуума, частично отвечающего индивидуума, не отвечающего индивидуума, индивидуума, у которого возникнет рецидив, или индивидуума, у которого не возникнет рецидива, при терапии CAR-экспрессирующими клетками. В некоторых вариантах осуществления различие, например, статистически значимое различие, между определенным уровнем и эталонным уровнем является прогностическим фактором для способности индивидуумов отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками.

В одном аспекте описанные способы включают (1) получение образца (например,

образца индивидуума, полученного посредством афереза; и/ или например, образца произведенного продукта, например, модифицированных способами генной инженерии Т-клеток, например, образца произведенного продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19); (2) получение, например, определение генной сигнатуры образца; и (3) (необязательно) сравнение генной сигнатуры с эталонной генной сигнатурой; где отличие, например, статистически значимое отличие, в уровне экспрессии одного или нескольких биомаркеров в определенной генной сигнатуре является прогностическим фактором для способности индивидуума отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками. В одном варианте осуществления генная сигнатура включает один или несколько маркеров, выбранных из таблицы 1А, таблицы 1В, таблицы 2, таблицы 3, таблицы 4, таблицы 5, таблицы 6, таблицы 7А, таблицы 7В, таблицы 8, таблицы 9, таблицы 10, таблицы 14 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблицы 17, таблицы 18, таблицы 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD 122, CD62L, KLRG1 и их комбинаций. В одном варианте осуществления образец представляет собой биологический образец, выбранный из образца крови, плазмы или сыворотки. В конкретном варианте осуществления биологический образец представляет собой образец крови. В одном варианте осуществления образец представляет собой образец, полученный посредством афереза, например, иммунные эффекторские клетки (например, Т-клетки), полученные из крови индивидуума. В одном варианте осуществления образец представляет собой образец произведенного продукта, например, модифицированных способами генной инженерии Т-клеток, например, произведенного продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19.

В одном аспекте предусматриваются способы определения способности к ответу у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, например, гематологическую злокачественную опухоль, например, такую как CLL или ALL, на лечение, включающее терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, например, описанными в настоящем описании. Способ включает: определение уровня или активности одного или нескольких биомаркеров (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более), приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1 в образце, полученном до лечения; где отличие, например, статистически значимое отличие, уровня (например, количества или активности) одного или нескольких маркеров в образце относительно заданной величины указывает на увеличенную способность к ответу на клетки, экспрессирующие CAR. В одном варианте осуществления образец представляет собой биологический образец, выбранный из образца крови, плазмы или сыворотки. В конкретном варианте осуществления биологический образец представляет собой образец крови. В одном варианте осуществления образец представляет собой образец, полученный посредством афереза, например, Т-клетки, полученные из крови индивидуума. В одном варианте осуществления образец представляет собой образец произведенного продукта, например, модифицированных способами генной инженерии Т-клеток, полученных из крови индивидуума, например, произведенного продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, произведенного продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19.

В одном варианте осуществления предусматриваются способы оценки индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, например, гематологическую злокачественную опухоль, например, такую как CLL или ALL, включающие получение величины статуса

ответа или рецидива для индивидуума, которая включает один или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) из следующих показателей: биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), Таблице 17, таблице 18, 5 таблице 20, биомаркер CD27, биомаркер CD45RO, биомаркер PD-1, биомаркер LAG-3, биомаркер TIM-3, биомаркер IL2RA, биомаркер IL21, биомаркер CD4+, биомаркер CD8+, сигнатура набора генов TH1+ Т-хелперных клеток, сигнатура набора генов TH2+ Т-хелперных клеток, сигнатура набора генов Т-клеток памяти (например, CD8+ Т-клеток памяти, например, наивных Т-клеток ( $T_N$ ), например стволовых клеток памяти 10 ( $T_{SCM}$ ), например центральных Т-клеток памяти ( $T_{CM}$ ), например, эффекторных Т-клеток памяти ( $T_{EM}$ )), и сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток), тем самым, оценивая индивидуума. В одном варианте осуществления способы включают количественное определение одного или нескольких из следующих: биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1, и сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19. В одном варианте осуществления способы 15 включают количественное определение одного или нескольких из следующих: биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1, и сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, 20 для оценки индивидуума, имеющего CLL. В другом варианте осуществления способы включают количественное определение одного или нескольких из следующих: биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1, и сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, 25 для оценки индивидуума, имеющего ALL. В одном варианте осуществления способ включает количественное определение одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) из следующих: биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1, или сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, в биологическом образце, выбранном из образца 30 крови, плазмы или сыворотки. В конкретном варианте осуществления биологический образец представляет собой образец крови. В одном варианте осуществления образец представляет собой образец, полученный посредством афереза, например, Т-клетки, 40 полученные из крови индивидуума. В одном варианте осуществления образец представляет собой образец произведенного продукта, например, модифицированных способами генной инженерии Т-клеток, например, полученных из крови индивидуума, например, произведенного продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, 45 произведенного продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19.

В одном варианте осуществления предусматриваются способы оценки или мониторинга эффективности терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), например, терапии клетками, экспрессирующими CAR

против CD19, у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, включающие получение величины статуса ответа или рецидива для индивидуума, которое включает количественное определение одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) из следующих: биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, 5 таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, биомаркер CD27, биомаркер CD45RO, биомаркер PD-1, биомаркер LAG-3, биомаркер TIM-3, биомаркер IL2RA, биомаркер IL21, биомаркер CD4+, биомаркер CD8+, сигнатура набора генов TH1+ Т-хелперных клеток, сигнатура набора генов TH2+ Т-хелперных клеток, 10 сигнатура набора генов Т-клеток памяти (например, CD8+ Т-клеток памяти, например, наивных Т-клеток ( $T_N$ ), например стволовых клеток памяти ( $T_{SCM}$ ), например центральных Т-клеток памяти ( $T_{CM}$ ), например, эффекторных Т-клеток памяти ( $T_{EM}$ )), и сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток), тем самым, оценивая или осуществляя мониторинг эффективности 15 терапии CAR-экспрессирующими клетками у индивидуума. В одном варианте осуществления способы включают количественное определение одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) из следующих: биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, 20 таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1, или сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19. В одном варианте осуществления способы включают количественное определение одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) из следующих: биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, 25 таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1, или сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, для оценки или мониторинга эффективности терапии CAR-экспрессирующими клетками у индивидуума, имеющего CLL. В другом варианте осуществления способы включают количественное определение 30 одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) из следующих: биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD 122, CD62L, 35 KLRG1, или сигнатура набора генов клетки, экспрессирующей CAR против CD19, для оценки или мониторинга эффективности терапии CAR-экспрессирующими клетками у индивидуума, имеющего ALL. В одном варианте осуществления способ включает количественное определение одного или нескольких из следующих (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более): биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, 40 таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1 или сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, в биологическом образце, выбранном из образца крови, плазмы или сыворотки. В конкретном варианте осуществления биологический образец представляет собой образец крови. В одном варианте осуществления образец 45 представляет собой образец, полученный посредством афереза, например, Т-клетки, полученные из крови индивидуума. В одном варианте осуществления образец представляет собой образец произведенного продукта, например, модифицированных способами генной инженерии Т-клеток, например, полученных из крови индивидуума.

В одном варианте осуществления предусматриваются способы прогнозирования вероятности успеха терапии CAR-экспрессирующими клетками, например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, например, описанными в настоящем описании, у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, причем указанный способ включает стадии предоставления биологического образца от индивидуума; определения уровней экспрессии одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) генов, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17a и/или IL-6) и таблице 17, для получения профиля экспрессии генов в образце; и на основе полученного профиля экспрессии генов предоставления прогноза для индивидуума. В одном варианте осуществления биологический образец включает, но не ограничивается ими, образец крови, плазмы или сыворотки. В конкретном варианте осуществления биологический образец представляет собой образец крови.

В одном варианте осуществления образец представляет собой образец, полученный посредством афереза, например, Т-клетки, полученные из крови индивидуума. В одном варианте осуществления индивидуум имеет CLL. В одном варианте осуществления индивидуум имеет ALL.

В другом аспекте предусматриваются способы лечения индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, например, гематологическую злокачественную опухоль. В одном варианте осуществления предусматриваются способы лечения индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, включающие определение того, имеет ли индивидуум отличие, например, статистически значимое отличие, в уровне экспрессии одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) маркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17a и/или IL-6) и таблице 17, относительно эталонного уровня, и, если существует отличие, например, статистически значимое отличие, между определенным уровнем и эталонным уровнем, введение индивидууму терапевтически эффективной дозы CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), тем самым, осуществляя лечение индивидуума. В одном варианте осуществления, где существует различие, например, статистически значимое различие, между определенным уровнем и эталонным уровнем, причем способ включает модификацию продукта CAR-экспрессирующих клеток перед инфузией индивидууму. В одном варианте осуществления, когда существует различие, например, статистически значимое различие, между определенным уровнем и эталонным уровнем, способ включает модификацию производства продукта CAR-экспрессирующих клеток перед инфузией индивидууму. В одном варианте осуществления если существует различие, например, статистически значимое различие, между определенным уровнем и эталонным уровнем, способ включает коррекцию инфузируемой дозы CAR-экспрессирующих клеток для достижения эффекта против злокачественной опухоли.

В одном варианте осуществления способы лечения, описанные в настоящем описании, включают определение того, имеет ли индивидуум вероятность ответа на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, путем сравнения уровня одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) маркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15 и таблице 16 (например, CCL20, IL-17a и/или IL-6) в образце от индивидуума относительно эталонного уровня, где отличие, например, статистически значимое отличие, в уровне

экспрессии одного или нескольких маркерных генов относительно эталонного уровня указывает на увеличенную вероятность ответа; и введение индивидууму терапевтически эффективной дозы CAR-экспрессирующих клеток, тем самым, осуществляя лечение индивидуума. В одном варианте осуществления образец выбран из образца крови, плазмы или сыворотки. В одном варианте осуществления образец представляет собой образец, полученный посредством афереза, например, Т-клетки, полученные из крови индивидуума.

В одном варианте осуществления способы лечения, описанные в настоящем описании, кроме того, включают получение образца от индивидуума; определение уровня одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) маркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1, в образце; сравнение определенного уровня одного или нескольких маркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1, с эталонным уровнем; и введение терапевтически эффективной дозы CAR-экспрессирующей клетки (например, Т-клетки, НК-клетки), если индивидуум идентифицирован как имеющий отличие, например, статистически значимое отличие, в определенном уровне одного или нескольких маркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1, относительно эталонного уровня, в образце.

В одном варианте осуществления способы лечения, описанные в настоящем описании, включают или дополнительно включают получение величины статуса ответа или рецидива для индивидуума, которая включает один или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) из следующих показателей: биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, биомаркер CD27, биомаркер CD45RO, биомаркер PD-1, биомаркер LAG-3, биомаркер TIM-3, биомаркер IL2RA, биомаркер IL21, биомаркер CD4, биомаркер CD8, сигнатура набора генов TH1+ Т-хелперных клеток, сигнатура набора генов TH2+ Т-хелперных клеток, сигнатура набора генов Т-клеток памяти (например, CD8+ Т-клеток памяти, например, наивных Т-клеток (T<sub>N</sub>), например, стволовых клеток памяти (T<sub>SCM</sub>), например, центральных Т-клеток памяти (T<sub>CM</sub>), например, эффекторных Т-клеток памяти (T<sub>EM</sub>)), и сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, и в соответствии с определением статуса ответа или рецидива, проведение одного, двух, трех, четырех или более из: идентификации индивидуума как полностью отвечающего, частично отвечающего или не отвечающего индивидуума; проведения терапии CAR-экспрессирующими клетками; выбора или изменения дозирования терапии CAR-экспрессирующими клетками; выбора или изменения схемы или продолжительности терапии CAR-экспрессирующими клетками; введения, например, не отвечающему индивидууму или частично отвечающему индивидууму, дополнительного средства в комбинации с терапией CAR-экспрессирующими клетками, например, ингибитором точки контроля, например, ингибитором точки контроля, описанным в настоящем описании, или ингибитором киназы, например, ингибитором киназы, описанным в настоящем описании; проведения не отвечающему индивидууму или частично

отвечающему индивидууму терапии, которая увеличивает количество наивных Т-клеток у индивидуума, перед проведением терапии CAR-экспрессирующими клетками; модификации процесса производства для терапии CAR-экспрессирующими клетками, например, увеличения в количестве наивных Т-клеток перед введением нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, например, для индивидуума, идентифицированного как не отвечающий индивидуум или частично отвечающий индивидуум; или выбора альтернативной терапии, например, стандартной терапии конкретной злокачественной опухоли (например, как описано в настоящем описании), например, для не отвечающего индивидуума, частично отвечающего индивидуума или индивидуума, у которого возникнет рецидив; тем самым, осуществляя лечение злокачественной опухоли у индивидуума.

#### *Системы*

В другом аспекте настоящее изобретение относится к наборам для прогнозирования ответа индивидуума на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанную в настоящем описании. Наборы содержат по меньшей мере один реагент, который специфически обнаруживает уровень или активность набора генов (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более генов), выбранных из таблицы 1А, таблицы 1В, таблицы 7А, таблицы 7В, таблицы 8, таблицы 9, таблицы 10, таблицы 14, таблицы 15, таблицы 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблицы 17, таблицы 18, таблицы 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и/или KLRG1; и инструкцию по применению наборов, например, для прогнозирования ответа индивидуума на терапию CAR-экспрессирующими клетками. В некоторых вариантах осуществления в указанных инструкциях по применению описано, что, если один или несколько обнаруженных уровней экспрессии отличаются, например превышают, от эталонного уровня, индивидуум с большей вероятностью будет положительно отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками. В некоторых вариантах осуществления в указанных инструкциях по применению описано, что, если один или несколько из обнаруженных уровней экспрессии является меньшим, чем эталонный уровень, индивидуум с большей вероятностью будет отвечать положительно на терапию CAR-экспрессирующими клетками. В некоторых вариантах осуществления, если уровень или активность PD-1, LAG-3 или TIM-3, или любой их комбинации, являются меньшими, чем эталонная величина, индивидуум с большей вероятностью будет положительно отвечать на терапию.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один реагент, который специфически обнаруживает уровни экспрессии набора генов, содержит зонд нуклеиновой кислоты, комплементарный мРНК, экспрессируемой с генов, например, кДНК или олигонуклеотид. Зонд нуклеиновой кислоты может быть иммобилизован на поверхности подложки или может находиться в растворе. Набор реагентов может обнаруживать экспрессию полипептидов, например, поверхностных полипептидов, кодируемых указанным набором генов. В одном варианте осуществления зонд нуклеиновой кислоты содержит нуклеиновую кислоту размером приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или 100 остатков нуклеиновой кислоты, комплементарных последовательности нуклеиновой кислоты биомаркера, приведенного в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и/или KLRG1. Кроме того, наборы

могут содержать одно или несколько из: буфер/реагенты и протокол для экстракции, буфер/реагенты и протокол для амплификации, буфер/реагенты и протокол для гибридизации и буфер/реагенты и протокол для мечения.

5 В определенных вариантах осуществления наборы, кроме того, содержат по меньшей мере одну сигнатуру набора генов клетки, экспрессирующей CAR против CD19 (например, Т-клетки, НК-клетки). В одном варианте осуществления набор, кроме того, включает стандартный эталон.

В одном варианте осуществления индивидуум имеет CLL.

В одном варианте осуществления индивидуум имеет ALL.

10 В одном варианте осуществления индивидуум имеет В-клеточный ALL.

В одном аспекте изобретение относится к реакционной смеси, содержащей по меньшей мере один реагент, который специфически выявляет уровни экспрессии набора генов (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более генов), выбранных из таблицы 1А, таблицы 1В, таблицы 7А, таблицы 7В, таблицы 8, таблицы 9, таблицы 10, таблицы 14, таблицы 15, 15 таблицы 16 (например, CCL20, IL-17a и/или IL-6), таблицы 17, таблицы 18, таблицы 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и/или KLRG1; и биологический образец. В одном варианте осуществления образец выбран из образца крови, плазмы или сыворотки. В одном варианте осуществления образец представляет собой образец, полученный посредством афереза, например, Т-клетки, полученные из крови 20 индивидуума. В одном варианте осуществления образец содержит CAR-экспрессирующие клетки, например, CART-экспрессирующие клетки, например, клетки CART19.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один реагент, который специфически выявляет уровни экспрессии набора генов, содержит зонд нуклеиновой кислоты, комплементарный мРНК, экспрессируемой с генов, например, кДНК или 25 олигонуклеотид. Зонд нуклеиновой кислоты может быть иммобилизован на поверхности подложки или может находиться в растворе. Набор реагентов может обнаруживать экспрессию полипептидов, например, поверхностных полипептидов, кодируемых указанным набором генов. В одном варианте осуществления зонд нуклеиновой кислоты включает нуклеиновую кислоту размером приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 30 50 или 100 остатков нуклеиновой кислоты, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты биомаркера, приведенного в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17a и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и/или KLRG1. Кроме того, реакционная смесь может 35 содержать одно или несколько из: буфер/реагенты и протокол для экстракции, буфер/реагенты и протокол для амплификации, буфер/реагенты и протокол для гибридизации и буфер/реагенты и протокол для мечения.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к системе для оценки злокачественной опухоли у индивидуума. Система содержит по меньшей мере один 40 процессор, функционально подсоединенный к памяти, причем по меньшей мере один процессор в процессе работы настроен на проведение одной или нескольких стадий, описанных в настоящем описании.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к системе для оценки злокачественной опухоли у индивидуума. Система включает по меньшей мере один 45 процессор, функционально подсоединенный к памяти, причем по меньшей мере один процессор в процессе работы настроен на:

получение величины статуса ответа или рецидива, которая включает один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или более (все) из следующих показателей:



(i) уровень или активность CD27 и/или CD45RO- (например, CD27+ CD45RO-) иммунных эффекторных клеток, например, в популяции CD4+ или CD8+ Т-клеток, в образце (например, образец, полученный посредством афереза, или образец продукта CAR-экспрессирующих клеток);

5 (ii) уровень или активность одного, двух, трех или более (например, всех) из покоящихся клеток T<sub>EFF</sub>, покоящихся клеток T<sub>REG</sub>, более молодых Т-клеток (например, более молодых CD4 или CD8 клеток, или гамма/дельта Т-клеток), или ранних Т-клеток памяти или их комбинации, в образце (например, образец, полученный посредством афереза, или образец продукта CAR-экспрессирующих клеток);

10 (iii) уровень или активность одного, двух, трех или более (например, всех) из активированных клеток T<sub>EFF</sub>, активированных клеток T<sub>REG</sub>, более старых Т-клеток (например, более старых CD4 или CD8 клеток), или поздних Т-клеток памяти или их комбинации, в образце (например, образец, полученный посредством афереза, или произведенный образец продукта CAR-экспрессирующих клеток);

15 (iv) уровень или активность маркера истощения иммунных клеток, например, одного, двух или нескольких ингибиторов иммунной точки контроля (например, PD-1, TIM-3 и/или LAG-3) в образце (например, образец, полученный посредством афереза, или произведенный образец продукта CAR-экспрессирующих клеток);

20 (v) уровень или активность одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, двадцати или более из биомаркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 16, таблице 17, таблице 18, таблице 20, на фиг.2В, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1 или сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19;

25 (vi) уровень или активность цитокинов (например, качество набора цитокинов) в образце продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, в образце продукта CAR19-экспрессирующих клеток (например, CTL019), где цитокин выбран из одного, двух, трех, четырех, пяти или более (или всех) из цитокинов, приведенных в таблице 16;

30 (vii) эффективность трансдукции CAR-экспрессирующих клеток в образце продукта CAR-экспрессирующих клеток; или

(viii) количество CD27+ PD-1- клеток у индивидуума, например, в образце от индивидуума (например, образец, полученный посредством афереза, или образец продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, в образце продукта CAR19-экспрессирующих клеток (например, CTL019)), например, количество, превышающее  
35 или равное  $1 \times 10^7$  клеток.

после определения величины статуса ответа проведение одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи или более (например, всех) из:

40 идентификации индивидуума как полностью отвечающего индивидуума, частично отвечающего индивидуума, не отвечающего индивидуума, индивидуума, у которого возникнет рецидив, или индивидуума, у которого не возникнет рецидива;

рекомендации проведения терапии CAR-экспрессирующими клетками;

рекомендации выбора или изменения дозирования терапии CAR-экспрессирующими клетками;

45 рекомендации выбора или изменения схемы или продолжительности терапии CAR-экспрессирующими клетками;

рекомендации введения, например, не отвечающему или частично отвечающему индивидууму, дополнительного средства в комбинации с терапией CAR-

экспрессирующими клетками, например, ингибитора точки контроля, например, ингибитора точки контроля, описанного в настоящем описании;

рекомендации проведения у не отвечающего или частично отвечающего индивидуума терапии, которая повышает количество наивных Т-клеток у индивидуума перед проведением терапии CAR-экспрессирующими клетками;

рекомендации модифицировать процесс производства для терапии CAR-экспрессирующими клетками, например, увеличения в количестве наивных Т-клеток перед введением нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, например, для индивидуума, идентифицированного как не отвечающий или частично отвечающий индивидуум;

рекомендации модифицировать продукт CAR-экспрессирующих клеток перед инфузией пациенту;

рекомендации скорректировать инфузируемую дозу CAR-экспрессирующих клеток для достижения клинической эффективности;

рекомендации проведения альтернативной терапии, например, для не отвечающего или частично отвечающего индивидуума или для индивидуума, у которого возникнет рецидив;

рекомендации выбрать альтернативную терапию, например, для не отвечающего индивидуума или частично отвечающего индивидуума, например, стандартную терапию для конкретного типа злокачественной опухоли, или

если индивидуум является или идентифицирован как не отвечающий индивидуум или индивидуум, у которого возникнет рецидив, рекомендации снизить популяцию клеток T<sub>REG</sub> и/или показатели сигнатуры клеток T<sub>REG</sub>, например, путем истощения CD25, введения циклофосфида, антитела против GITR, ингибитора mTOR или их комбинации.

В одном варианте осуществления величина включает показатель сигнатуры наборы генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, и комбинацию одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) из: биомаркера, приведенного в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, биомаркера CD27, биомаркера CD45RO, биомаркера PD-1, биомаркера LAG-3, биомаркера TIM-3, биомаркера IL2RA, биомаркера IL21, биомаркера CD4, биомаркера CD8, сигнатуры набора генов TH1+ Т-хелперных клеток, сигнатуры набора генов TH2+ Т-хелперных клеток и сигнатуры набора генов Т-клеток памяти (например, CD8+ Т-клеток памяти, например, наивных Т-клеток (T<sub>N</sub>), например, стволовых клеток памяти (T<sub>SCM</sub>), например, центральных Т-клеток памяти (T<sub>CM</sub>), например эффекторных Т-клеток памяти (T<sub>EM</sub>)); и после определения величины статуса ответа, проведение одного, двух, трех, четырех или более из: идентификации индивидуума как полностью отвечающего, частично отвечающего или не отвечающего индивидуума; рекомендации терапии CAR-экспрессирующими клетками; рекомендации выбора или изменения дозирования терапии CAR-экспрессирующими клетками; рекомендации альтернативной терапии, рекомендации комбинированной терапии, например, комбинации с терапией CAR-экспрессирующими клетками, рекомендации изменить процесс производства для терапии CAR-экспрессирующими клетками.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один процессор во время работы настроен на: получение величины статуса ответа, которая включает показатель сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, и комбинации одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) из: биомаркера, приведенного в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9,

таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17a и/или IL-6),  
таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и  
KLRG1; и после определения величины статуса ответа проведение одного, двух, трех,  
5 четырех или более из: идентификации индивидуума как полностью отвечающего,  
частично отвечающего или не отвечающего индивидуума; рекомендации терапии CAR-  
экспрессирующими клетками; рекомендации выбора или изменения дозирования терапии  
CAR-экспрессирующими клетками; рекомендации альтернативной терапии, например,  
стандартной терапии для конкретной злокачественной опухоли (например, как описано  
10 в настоящем описании); рекомендации комбинированной терапии, например, комбинации  
с терапией CAR-экспрессирующими клетками, рекомендации изменить процесс  
производства для терапии CAR-экспрессирующими клетками, например, как описано  
в настоящем описании.

#### *Способы производства*

В другом аспекте изобретение относится к способу оценки эффективности продукта  
15 CAR-экспрессирующих клеток, например, образца продукта CAR19-экспрессирующих  
клеток (например, CTL019). Способ включает получение одной, двух, трех, четырех,  
пяти, шести, семи, восьми или более (например, всех) из величин:

- (i) уровень или активность CD27 и/или CD45RO- (например, CD27+ CD45RO-) иммунных эффекторных клеток, например, в популяции CD4+ или CD8+ Т-клеток, в  
20 продукте CAR-экспрессирующих клеток;
- (ii) уровень или активность одного, двух, трех или более (например, всех) из покоящихся клеток T<sub>EFF</sub>, покоящихся клеток T<sub>REG</sub>, более молодых Т-клеток (например, более молодых CD4 или CD8 клеток, или гамма/дельта Т-клеток), или ранних Т-клеток памяти или их комбинации в продукте CAR-экспрессирующих клеток;
- 25 (iii) уровень или активность одного, двух, трех или более (например, всех) из активированных клеток T<sub>EFF</sub>, активированных клеток T<sub>REG</sub>, более старых Т-клеток (например, более старых CD4 или CD8 клеток), или поздних Т-клеток памяти или их комбинации в продукте CAR-экспрессирующих клеток;
- (iv) уровень или активность маркера истощения иммунных клеток, например, одного,  
30 двух или нескольких ингибиторов иммунной точки контроля (например, PD-1, TIM-3 и/или LAG-3) в продукте CAR-экспрессирующих клеток;
- (v) уровень или активность одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, двадцати или более из биомаркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14 (например, CCL20, IL-17a и/или IL-6), таблице  
35 16, таблице 17, таблице 18, таблице 20, на фиг.2В, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1 или сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19;
- (vi) уровень или активность цитокинов в образце продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, в образце продукта CAR19-экспрессирующих клеток (например,  
40 CTL019), где цитокин выбран из одного, двух, трех, четырех, пяти или более (или всех) из цитокинов, приведенных в таблице 16;
- (vii) эффективность трансдукции CAR-экспрессирующих клеток в продукте;
- (viii) количество CD27+ PD-1- клеток у индивидуума, например, в образце от индивидуума (например, образец, полученный посредством афереза, или образец  
45 продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, в образце продукта CAR19-экспрессирующих клеток (например, CTL019)), например, количество, превышающее или равное  $1 \times 10^7$  клеток; или

(ix) уровень или активность клеток T<sub>REG</sub> или клеточной популяции,

где увеличение (i), (ii), (vi), (vii), (viii) или любой их комбинации указывает на увеличенную эффективность продукта CAR-экспрессирующих клеток, и

где увеличение (iii), (iv), (ix) или любой их комбинации указывает на снижение эффективности продукта CAR-экспрессирующих клеток.

В родственном аспекте изобретение относится к способу оптимизации производства продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, образца продукта клеток, экспрессирующих CAR19 (например, CTL019). Способ включает:

(1) получение образца, содержащего CAR-экспрессирующую клетку (например, популяцию CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток);

(2) активацию CAR-экспрессирующей клетки *in vitro*;

(3) оценку эффективности активированных CAR-экспрессирующих клеток посредством определения одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более (например, всех) из:

(i) уровень или активность CD27 и/или CD45RO- (например, CD27+ CD45RO-) иммунных эффекторных клеток, например, в популяции CD4+ или CD8+ Т-клеток, в продукте CAR-экспрессирующих клеток;

(ii) уровень или активность одного, двух, трех или более (например, всех) из покоящихся клеток T<sub>EFF</sub>, покоящихся клеток T<sub>REG</sub>, более молодых Т-клеток (например, более молодых CD4 или CD8 клеток, или гамма/дельта Т-клеток), или ранних Т-клеток памяти или их комбинации в продукте CAR-экспрессирующих клеток;

(iii) уровень или активность одного, двух, трех или более (например, всех) из активированных клеток T<sub>EFF</sub>, активированных клеток T<sub>REG</sub>, более старых Т-клеток (например, более старых CD4 или CD8 клеток), или поздних Т-клеток памяти или их комбинации в продукте CAR-экспрессирующих клеток;

(iv) уровень или активность маркера истощения иммунных клеток, например, одного, двух или нескольких ингибиторов иммунной точки контроля (например, PD-1, TIM-3 и/или LAG-3) в продукте CAR-экспрессирующих клеток;

(v) уровень или активность одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, двадцати или более из биомаркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 16, таблице 17, таблице 18, таблице 20, на фиг.2В, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1 или сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19;

(vi) уровень или активность цитокинов в образце продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, в образце продукта CAR19-экспрессирующих клеток (например, CTL019), где цитокин выбран из одного, двух, трех, четырех, пяти или более (или всех) из цитокинов, приведенных в таблице 16;

(vii) эффективность трансдукции CAR-экспрессирующих клеток в продукте;

(viii) количество CD27+ PD-1- клеток у индивидуума, например, в образце от индивидуума (например, образец, полученный посредством афереза, или образец продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, в образце продукта CAR19-экспрессирующих клеток (например, CTL019)), например, количество, превышающее или равное  $1 \times 10^7$  клеток; или

(ix) уровень или активность клеток T<sub>REG</sub> или клеточной популяции,

где увеличение (i), (ii), (vi), (vii), (viii) или любой их комбинации указывает на увеличенную эффективность продукта CAR-экспрессирующих клеток, и

где увеличение (iii), (iv), (ix) или любой их комбинации указывает на снижение эффективности продукта CAR-экспрессирующих клеток.

В родственном аспекте в настоящем описании описан процесс производства продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, клеток, экспрессирующих CAR против CD19, например, клеток, экспрессирующих CAR против CD19, описанных в настоящем описании, например, CTL019) для определения действенности или эффективности продукта. В одном варианте осуществления предусматриваемые способы включают стадии предоставления биологического образца от индивидуума, например, образца крови, сыворотки или плазмы; определения уровней экспрессии одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или более) генов, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1, с получением профиля экспрессии генов в образце; (необязательно) сравнения полученного профиля экспрессии генов с заданной величиной; и определения отличий между полученной и заданной величиной. В одном варианте осуществления определенное отличие регистрируют в протоколе по контролю качества.

В некоторых вариантах осуществления любые из способов, описанных в настоящем описании, кроме того, включают стадию увеличения в количестве, например, выделения клеток согласно любому из (i), (ii), (vi), (vii), (viii), или любой их комбинации, или снижения любого из (iii), (iv), (ix), или любой их комбинации.

В другом аспекте изобретение относится к способу производства образца продукта, например, модифицированных способами инженерии Т-клеток, например, полученных из крови индивидуума, например, произведенного продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), например, продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19, например, продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19, описанных в настоящем описании (например, CTL019). В одном варианте осуществления способ включает:

предоставление произведенного образца продукта, например, модифицированных способами инженерии Т-клеток, например, полученных из крови индивидуума, например, произведенного продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19, например, продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19, описанных в настоящем описании (например, CTL019);

(i) получение профиля экспрессии цитокинов (например, приведенных в таблице 14, таблице 15 или таблице 16 (например, CCL20, IL-6 и/или IL-17а)), секретируемых в продукте CAR-экспрессирующих клеток; и/или

(ii) получение показателя эффективности трансдукции CAR-экспрессирующих клеток в продукте;

идентификацию продукта CAR-экспрессирующих клеток в качестве пригодного для введения на основе определенного уровня цитокинов или эффективности трансдукции (или обоих из них); и

необязательно, выбор продукта CAR-экспрессирующих клеток для введения индивидууму,

тем самым, изготавливая продукт CAR-экспрессирующих клеток.

В определенных вариантах осуществления вышеупомянутых способов производства цитокин выбран из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более (или всех) из CCL20/MIP3а, IL17А, IL6, GM-CSL, IFN $\gamma$ , IL10, IL13, IL2, IL21, IL4, IL5, IL9 или TNF $\alpha$ , или их комбинации. В одном варианте осуществления цитокин выбран из

одного, двух, трех, четырех или более (всех из) IL-17a, CCL20, IL2, IL6 или TNF $\alpha$ .

Например, цитокин может быть выбран из: одного или обоих из IL-17a и CCL20; одного или обоих из CCL20/MIP3a и IL17A; или одного, двух или всех из CCL20/MIP3a, IL17A и IL6. В одном варианте осуществления цитокин представляет собой CCL20/MIP3a. В другом варианте осуществления цитокин представляет собой IL17A. В другом варианте осуществления цитокин представляет собой IL6.

В определенных вариантах осуществления вышеупомянутых способов производства эффективность трансдукции 15% или выше указывает на увеличенную эффективность. В других вариантах осуществления эффективность трансдукции менее 15% указывает на сниженную эффективность.

В определенных вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов производства способы, кроме того, включают уменьшение количества (например, истощение) клеток Treg, например, посредством истощения CD25, истощения GITR или ингибирования mTOR. Альтернативно или в комбинации, способы производства, кроме того, включают приведение в контакт образца, например, образца, полученного посредством афереза, с антителом против GITR.

В определенных вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов производства каждый из (i), (ii) или (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii), (ix), или любую их комбинацию (например, все) оценивают после активации *in vitro*.

В одном варианте осуществления профиль цитокинов включает один или несколько (например, один, два, три, четыре, пять, шесть или более) из CCL20 (также обозначаемого как MIP3a), IL-17a, IL-6, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-10, IL-13, IL-2, IL-21, IL-4, IL-5, IL-9 и TNF $\alpha$ . В одном варианте осуществления профиль цитокинов включает CCL20. В одном варианте осуществления профиль цитокинов включает IL-17a. В одном варианте осуществления профиль цитокинов включает IL-6. В одном варианте осуществления профиль цитокинов включает два или более (например, все три) из CCL20, IL-17a и IL-6.

В одном варианте осуществления способ, кроме того, включает определение уровня экспрессии одного или нескольких цитокинов, приведенных в таблице 14, таблице 15 или таблице 16 (например, CCL20, IL-17a и/или IL-6), секретируемых продуктом CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток). В одном варианте осуществления секреция одного или нескольких цитокинов, приведенных в таблице 14, таблице 15 или таблице 16 (например, CCL20, IL-17a и/или IL-6) осуществляется в ответ на стимуляцию продукта CAR-экспрессирующих клеток одним или несколькими антигеном(ами) опухоли-мишени.

В одном варианте осуществления сигнатура или уровень цитокинов, описанные в настоящем описании, указывают на эффективность продукта CAR-экспрессирующих клеток. В одном варианте осуществления сигнатуры цитокинов, описанные в настоящем описании, являются маркерами ответа на продукт CAR-экспрессирующих клеток при гематологической злокачественной опухоли (например, CLL и ALL).

В одном варианте осуществления сигнатура или уровень цитокинов, описанные в настоящем описании, прогнозируют ответ индивидуума на продукт CAR-экспрессирующих клеток.

В одном варианте осуществления сигнатура или уровень цитокинов, описанные в таблице 16, прогнозируют ответ индивидуума на продукт CAR-экспрессирующих клеток.

В одном варианте осуществления уровень экспрессии IL-17a и CCL-20 прогнозирует ответ индивидуума на продукт CAR-экспрессирующих клеток.

В одном варианте осуществления способ, кроме того, включает одно или несколько

(например, одно, два, три или все) из: получения образца крови, например, популяции Т-клеток, полученных из крови индивидуума; активации популяции Т-клеток, например, способом, описанным в настоящем описании; модификации способами генной инженерии клеток из популяции Т-клеток, например, трансдукции клеток из популяции Т-клеток, вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, например, CAR, описанный в настоящем описании, например, CAR против CD19, описанный в настоящем описании, например, CTL019; увеличения в количестве популяции Т-клеток, которая содержит модифицированные способами инженерии Т-клетки, например, клетки, трансдуцированные нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, например, CAR, описанный в настоящем описании, например, CAR против CD19, описанный в настоящем описании, например, способом, описанным в настоящем описании.

В одном варианте осуществления эффективность трансдукции CAR, описанная в настоящем описании, указывает на ответ индивидуума на терапию CAR-экспрессирующими клетками при гематологической злокачественной опухоли (например, CLL и ALL).

В одном варианте осуществления эффективность трансдукции CAR, описанная в настоящем описании, прогнозирует ответ индивидуума на терапию CAR-экспрессирующими клетками при гематологическом заболевании (например, CLL и ALL).

В одном варианте осуществления сигнатуру или уровень цитокинов, описанные в настоящем описании, используют для улучшения и/или модификации продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19, например, такого как CTL019) перед инфузией пациентам.

В одном варианте осуществления сигнатуру или уровень цитокинов, описанные в настоящем описании, используют для оценки произведенных продуктов CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток). В одном варианте осуществления сигнатура или уровень цитокинов, описанные в настоящем описании, обеспечивают конечную точку оптимизации процесса производства.

В одном варианте осуществления любой из вышеупомянутых способов производства включает стадию регистрации результата сравнения протоколов по контролю качества для препарата CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, препарата клеток, экспрессирующих CAR против CD19, как описано в настоящем описании, например, таких как CTL019). В одном варианте осуществления способ дополнительно включает получение препарата Т-клеток от индивидуума, идентифицированного как частично отвечающий или не отвечающий индивидуум, и увеличение количества наивных Т-клеток в препарате. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в препарат Т-клеток.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает получение препарата иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток) от индивидуума, идентифицированного как частично отвечающий или не отвечающий индивидуумом, которого впоследствии лечили средством, которое повышает количество наивных Т-клеток у индивидуума, например, от индивидуума, которого лечили ингибитором киназы, например, ингибитором mTOR, например, как описано в настоящем описании, и/или ингибитором точки контроля, например, как описано в настоящем описании. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в множество иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток) в препарате.

В одном варианте осуществления продукт CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) представляет собой клетку, экспрессирующую CAR против CD19, например, клетку, экспрессирующую CAR против CD19, описанную в настоящем описании, например, CTL019.

5 В другом аспекте, настоящее изобретение относится к одной или нескольким генным сигнатурам или профилям экспрессии, которые отличают индивидуумов, у которых возникнет рецидив при терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) от индивидуумов, у которого не возникнет рецидива при  
10 терапии CAR-экспрессирующими клетками при злокачественной опухоли, например, гематологической злокачественной опухоли (например, ALL и CLL).

В одном варианте осуществления одна или несколько генных сигнатур или профилей экспрессии, описанных в настоящем описании, обеспечивают улучшение произведенных  
15 продуктов, тем самым, снижая вероятность рецидива у пациентов. В одном варианте осуществления генные сигнатуры, описанные в настоящем описании, используют для модификации терапевтического применения произведенного продукта, тем самым, снижая вероятность рецидива у пациента.

В одном варианте осуществления у индивидуума перед лечением CAR-экспрессирующими клетками (например, лечение клетками, экспрессирующими CAR против CD19, например, терапия CTL019) идентифицируют одну или несколько генных  
20 сигнатур или профилей экспрессии, описанных в настоящем описании, которые прогнозируют рецидив при лечении CAR-экспрессирующими клетками. В одном варианте осуществления одну или несколько генных сигнатур или профилей экспрессии, описанных в настоящем описании, идентифицируют в образце, полученном посредством афереза. В одном варианте осуществления одну или несколько генных сигнатур или  
25 профилей экспрессии, описанных в настоящем описании, идентифицируют в образце костного мозга. В одном варианте осуществления одну или несколько генных сигнатур или профилей экспрессии, описанных в настоящем описании, идентифицируют в произведенном продукте CAR-экспрессирующих клеток (например, продукт клеток, экспрессирующих CAR против CD19, например, CTL019) перед инфузией.

30 В одном варианте осуществления снижение уровня или показателя генной сигнатуры T<sub>REG</sub> у индивидуума перед аферезом или в процессе производства продукта CAR-экспрессирующих клеток значительно снижает риск рецидива у индивидуума.

В одном варианте осуществления индивидуума предварительно лечат одним или  
35 несколькими способами терапии, которые снижают уровень клеток T<sub>REG</sub>, перед сбором клеток для производства продукта CAR-экспрессирующих клеток, тем самым, снижая риск рецидива у индивидуума при лечении CAR-экспрессирующими клетками (например, лечении CTL019).

В одном варианте осуществления способы снижения уровня клеток T<sub>REG</sub> включают,  
40 но не ограничиваются ими, введение индивидууму одного или нескольких из циклофосфида, антитела против GITR, средства для истощения CD25, ингибитора mTOR или их комбинации. Введение одного или нескольких из циклофосфида, антитела против GITR, средства для истощения CD25, ингибитора mTOR или их комбинации можно осуществлять до, в процессе или после инфузии продукта CAR-экспрессирующих клеток.  
45

В одном варианте осуществления индивидуума предварительно лечат циклофосфамидом перед сбором клеток для производства продукта CAR-экспрессирующих клеток, тем самым, снижая риск рецидива индивидуума при лечении



CAR-экспрессирующими клетками (например, лечения CTL019).

В одном варианте осуществления индивидуума предварительно лечат антителом против GITR перед сбором клеток для производства продукта CAR-экспрессирующих клеток, тем самым, снижая риск рецидива у индивидуума при лечении CAR-экспрессирующими клетками (например, лечение CTL019).

В одном варианте осуществления процесс производства CAR-экспрессирующих клеток модифицируют для истощения клеток T<sub>REG</sub> перед производством продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, продукта CTL019). В одном варианте осуществления истощение CD25 используют для истощения клеток T<sub>REG</sub> перед производством продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, продукта CTL019). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает:

а. предоставление популяции иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или NK-клеток); и

б. удаление Т-регуляторных клеток из популяции, тем самым, обеспечивая популяцию клеток с истощением Т-регуляторных клеток;

где стадии а) и б) проводят перед введением нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в популяцию.

В некоторых вариантах осуществления способов Т-регуляторные клетки включают CD25+ Т-клетки, и их удаляют из клеточной популяции с использованием антитела против CD25 или его фрагмента. Антитело против CD25 или его фрагмент могут быть конъюгированы с подложкой, например, гранулами.

В других вариантах осуществления популяция клеток с истощением Т-регуляторных клеток, предоставленная на стадии (б), содержит менее 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% CD25+ клеток.

В других вариантах осуществления способ дополнительно включает удаление из популяции клеток, которые экспрессируют опухолевый антиген, которые не содержат CD25, для получения популяции клеток с истощением Т-регуляторных клеток и истощением опухолевого антигена перед введением нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в популяцию. Опухолевый антиген может быть выбран из CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 или CD11b, или их комбинации.

В других вариантах осуществления способ дополнительно включает удаление из популяции клеток, которые экспрессируют ингибитор точки контроля, с получением популяции клеток с истощением Т-регуляторных клеток и истощением ингибиторной молекулы перед введением нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в популяцию.

Ингибиторная молекула, например, ингибитор точки контроля, может быть выбрана из PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAL9, аденозина и TGFR (например, TGFR-бета), например, как описано в настоящем описании.

Следующие варианты осуществления, описанные в настоящем описании, охватывают предоставление популяции иммунных эффекторных клеток. Предоставленная популяция иммунных эффекторных клеток может быть выбрана, исходя из экспрессии одного или нескольких из CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO. В определенных вариантах осуществления предоставленная популяция иммунных эффекторных клеток представляет собой CD3+ и/или CD28+ клетки.

В определенных вариантах осуществления способа, способ дополнительно включает увеличение в количестве популяции клеток после введения молекулы нуклеиновой

кислоты, кодирующей CAR.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток увеличивают в количестве в течение 8 суток или менее.

5 В определенных вариантах осуществления популяцию клеток увеличивают в количестве в культуре в течение 5 суток и полученные клетки являются более эффективными, чем те же клетки, которые увеличивали в количестве в культуре в течение 9 суток, в тех же условиях культивирования.

10 В других вариантах осуществления популяцию клеток увеличивают в количестве в культуре в течение 5 суток, и она демонстрирует по меньшей мере однократное, двукратное, трехкратное или четырехкратное увеличение удвоенных клеток при стимуляции антигеном по сравнению с теми же клетками, которые увеличивали в количестве в культуре в течение 9 суток в тех же условиях культивирования.

15 В других вариантах осуществления популяцию клеток увеличивают в количестве в культуре в течение 5 суток и полученные клетки демонстрируют более высокие уровни провоспалительного IFN- $\gamma$  и/или GM-CSF по сравнению с теми же клетками, которые увеличивали в количестве в культуре в течение 9 суток в тех же условиях культивирования.

20 В других вариантах осуществления популяцию клеток увеличивают в количестве путем культивирования клеток в присутствии средства, которое стимулирует ассоциированный с комплексом CD3/TCR сигнал, и/или лиганда, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности клеток. Средство можно конъюгировать на гранулах с антителом против CD3 или его фрагментом и/или антителом против CD28 или его фрагментом.

25 В других вариантах осуществления популяцию клеток увеличивают в количестве в подходящей среде, которая включает один или несколько интерлейкинов, которые приводят к увеличению количества клеток по меньшей мере в 200 раз, 250 раз, 300 раз или 350 раз в ходе периода увеличения в количестве в течение 14 суток при измерении посредством проточной цитометрии.

30 В других вариантах осуществления популяцию клеток увеличивают в количестве в присутствии IL-15 и/или IL-7.

В определенных вариантах осуществления способ, кроме того, включает криоконсервацию популяции клеток после соответствующего периода увеличения в количестве.

35 В других вариантах осуществления способ получения, описанный в настоящем описании, кроме того, включает приведение в контакт популяции иммунных эффекторных клеток с нуклеиновой кислотой, кодирующей субъединицу теломеразы, например, hTERT. Нуклеиновая кислота, кодирующая субъединицу теломеразы, может представлять собой ДНК.

40 В других вариантах осуществления способ получения, описанный в настоящем описании, кроме того, включает культивирование популяции иммунных эффекторных клеток в сыворотке, включающей 2% сыворотку hAB.

В любых из способов, систем и наборов, описанных в настоящем описании, CAR против CD19 может содержать связывающий CD19 домен, описанный в таблице 12, или CDR, например, одну или несколько (например, все) из CDR1HC, CDR2HC, CDR3HC, 45 CDR1LC, CDR2LC и CDR3 LC связывающего CD19 домена, описанного в таблице 12. В одном варианте осуществления CAR может содержать одно или несколько из: лидерной последовательности, например, лидерной последовательности, описанной в настоящем описании, например, в таблице 11; связывающего CD19 домена, например,

связывающего CD19 домена, описанного в настоящем описании, например, в таблице 12; шарнирной области, например, шарнирной области, описанной в настоящем описании, например, шарнирной области, описанной в таблице 11; трансмембранного домена, например, трансмембранного домена, описанного в настоящем описании, например, в таблице 11; и внутриклеточного сигнального домена (например, костимулирующего домена /или первичного сигнального домена, например, костимулирующего домена, описанного в настоящем описании, например, в таблице 11 и/или первичного сигнального домена, описанного в настоящем описании, например, в таблице 11). В одном варианте осуществления клетка, экспрессирующая CAR против CD19 (например, Т-клетка, НК-клетка) представляет собой CTL019 или клетку с CAR против CD19, описанные в таблице 13.

Хотя при применении на практике или исследовании настоящего изобретения можно использовать способы и материалы, сходные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем описании, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки (например, ссылочные номера в базе данных последовательностей), упоминаемые в настоящем описании, включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Например, все последовательности GenBank, Unigene и Entrez, упоминаемые в настоящем описании, например, в любой из таблиц настоящего описания, например, в любой из таблицы 1А, таблицы 1В, таблицы 7А, таблицы 7В, таблицы 8, таблицы 14, таблицы 17, таблицы 18 и таблицы 20, включены в настоящее описание в качестве ссылок. Если нет иных указаний, номера доступа последовательностей, упоминаемые в настоящем описании, в том числе в любой из таблиц настоящего описания, например, в любой из таблицы 1А, таблицы 1В, таблицы 7А, таблицы 7В, таблицы 8, таблицы 14, таблицы 17, таблицы 18 и таблицы 20, относятся к записям в базе данных на 8 октября 2014 года. Когда ген или белок имеет ссылку на множество номеров доступа последовательностей, то все варианты последовательностей охватываются.

Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Заголовки, подзаголовки или пронумерованные или обозначенные буквами элементы, например, (a), (b), (i) и т.д., предоставлены только для простоты прочтения. Использование заголовков или пронумерованных или обозначаемых буквами элементов в настоящем документе не требует, чтобы выполнение стадий или элементы следовали в алфавитном порядке, или что стадии или элементы необходимо отделять друг от друга. Другие признаки, задачи и преимущества изобретения станут очевидными из описания и чертежей, и из формулы изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 представлена иллюстративная модель, иллюстрирующая данные полногеномного анализа RNAseq CTL019, проведенного для Т-клеток при аферезе и после производства CTL019, для 21 образца CLL и 7 образцов ALL. Эта модель демонстрирует, что профили экспрессии у полностью отвечающих индивидуумов (CR) имеют более молодой фенотип Т-клеток, чем профили экспрессии у не отвечающих индивидуумов (NR). Содержание подгрупп Т-клеток памяти различается между CR и NR, причем у CR они демонстрируют сходство с Т-клетками памяти.

На фиг.2А представлена иллюстративная гистограмма количества образцов, проанализированных в полногеномном анализе RNAseq CTL019, описанном в настоящем описании. р=продукт; а=аферез. На фиг.2В представлена иллюстративная схема, иллюстрирующая обзор анализа. В кратком изложении, для каждого набора генов использовали статистическую модель для 3 групп для определения наличия

статистически значимых отличий метагенов между продуктами CR, PR и NR при CLL. CR в большей мере имеют покоящиеся клетки  $T_{EFF}$ , в то время как NR в большей мере имеют активированные клетки  $T_{EFF}$ . Образцы CTL019 NR имеют более активированное состояние, чем образцы CR.

5 На фиг.3 представлена иллюстративная схема предшественников и подгрупп Т-клеток памяти. Без связи с конкретной теорией, состояние Т-клеток памяти в образцах CTL019, вероятно, является основным компонентом ответа.

10 На фиг.4 представлен иллюстративный результат, иллюстрирующий показатели метагенов для набора активированных генов в  $T_{SCM}$  против  $T_{CM}$ . На оси x представлены образцы по группе ответа, где а=аферез и р=продукт. На оси y представлены нормализованные показатели экспрессии метагенов. Наборы генов, перепредставленные у CR при CLL (например, CR в случае CTL019), также перепредставлены при остром лимфобластном лейкозе (ALL). ALL и CLL у CR имеют перепредставленные гены, специфичные для подгруппы стволовых Т-клеток ( $T_{SCM}$ ), в то время как CLL у PR и NR имеют перепредставленные гены подгруппы центральных Т-клеток памяти ( $T_{CM}$ ). При аферезе наблюдают тот же профиль, что и в образцах продуктов. Профили экспрессии ALL являются наиболее сходными с профилями экспрессии CLL у CR и являются еще более значительными для покоящихся/нестимулированных/ранних Т-клеток памяти.

20 На фиг.5А представлен иллюстративный результат анализа основных компонентов (PCA) для образцов CTL019. Этот иллюстративный результат PCA показывает, что образцы CR, ALL и нормальные образцы кластеризуются отдельно от PR и NR. На фиг.5В представлен иллюстративный результат PCA для CTL019 и образцов, полученных посредством афереза. Этот иллюстративный результат PCA иллюстрирует, что образцы 25 CR, ALL и нормальные образцы кластеризуются отдельно от PR и NR и от кластера, полученного посредством афереза.

На фиг.6 представлена иллюстративная схема, изображающая иммунофенотипирование образцов, полученных посредством афереза, и образцов продукта.

30 На фиг.7А и фиг.7В представлены иллюстративные результаты многоцветного проточно-цитометрического анализа, идентифицирующие корреляцию ответа в образцах продукта. Анализировали 36 образцов произведенных CTL019 от пациентов с CLL. Образцы включали 5 CR, 8 PR, 19 NR и 3 неопределенных. На фиг.7А представлен иллюстративный результат, иллюстрирующий процент CD4+ клеток и ответ пациента. 35 На фиг.7В представлен иллюстративный результат, иллюстрирующий процент CD8+ клеток и ответ пациента.

40 На фиг.8А, фиг.8В, фиг.8С и фиг.8D представлен иллюстративный проточно-цитометрический анализ экспрессии PD1 и CAR19 на Т-клетках. На фиг.8А и фиг.8В представлены репрезентативные профили проточной цитометрии, демонстрирующие распределение экспрессии PD-1 и CAR19 на CD4+ Т-клетках от индивидуумов, которые являются полностью отвечающими (CR) или не отвечающими (NR) на терапию клетками, экспрессирующими CAR. На фиг.8С представлен график, демонстрирующий процент клеток PD1 в популяции CD4+ Т-клеток в группах индивидуумов с различными ответами на терапию CAR-экспрессирующими клетками. На фиг.8D представлен график, 45 демонстрирующий процент PD1-клеток в популяции CD8+ Т-клеток в группах индивидуумов с различными ответами на терапию CAR-экспрессирующими клетками.

На фиг.9А и фиг.9В представлены иллюстративные результаты проточно-цитометрического анализа экспрессии PD1, CAR19 и LAG-3 на Т-клетках индивидуумов,

которые являются полностью отвечающими (CR) или не отвечающими (NR) на терапию CAR-экспрессирующими клетками. на фиг.9С представлены иллюстративные результаты, которые демонстрируют распределение экспрессии PD1 и LAG-3 в группах индивидуумов с различными ответами на терапию CAR-экспрессирующими клетками. Продукты не отвечающих индивидуумов (NR) имеют более высокий процент PD1+ CAR19+ LAG3+ Т-клеток, чем CR. Эти данные показывают, что продукты NR демонстрируют фенотип истощения PD1+ CAR+ и коэкспрессию LAG3.

На фиг.10А и фиг.10В представлены иллюстративные результаты проточно-цитометрического анализа экспрессии PD1, CAR 9 и TIM-3 на Т-клетках индивидуумов, которые являются полностью отвечающими (CR) или не отвечающими (NR) на терапию CAR-экспрессирующими клетками. На фиг.1С представлены иллюстративные результаты, которые демонстрируют распределение экспрессии PD1 и TIM-3 в группах индивидуумов с различными ответами на терапию CAR-экспрессирующими клетками. Продукты не отвечающих индивидуумов (NR) имеют более высокий процент CAR19+ PD1+ TIM3+ клеток, чем продукты CR. Эти данные показывают, что продукты NR демонстрируют фенотип истощения PD1+ CAR+ и коэкспрессию TIM3.

На фиг.11 показан иллюстративный результат, показывающий, что уровни CD27 в продукте CAR коррелируют с ответом пациента. CD8+ клетки CR продемонстрировали более высокий процент CD27+ клеток по сравнению с PR и NR.

На фиг.12 показан иллюстративный результат многоцветного проточно-цитометрического анализа, идентифицирующий корреляцию ответа в образцах, полученных посредством афереза. Анализировали 26 образцов, полученных посредством афереза, от пациентов с CLL. Образцы включали 4 CR, 6 PR, 14 NR и 1 пациента, которому инфузию не проводили.

На фиг.13 представлен результат иллюстративного многоцветного проточно-цитометрического анализа, иллюстрирующий корреляцию между фенотипом более молодых Т-клеток и ответом на терапию CTL019. Эти данные демонстрируют, что процент CD27+ CD45RO- среди CD8+ Т-клеток прогнозирует, какие пациенты с CLL будут иметь полный ответ на CTL019.

На фиг.14 представлен иллюстративный анализ образцов, полученных посредством афереза, у пациента-человека перед терапией CTL019. Иллюстративные результаты показывают, что, хотя пациент 1000-00045 имел очень мало Т-клеток, 27% Т-клеток были CD8+ CD27+ CD45RO-.

На фиг.15 представлен иллюстративный результат ответа пациента (пациент 1000-00045) на терапию CTL019. CD8+ CD27+ CD45RO- Т-клетки были положительным прогностическим фактором ответа пациента на терапию CTL019. Эти иллюстративные результаты показывают, что хороший прогностический фенотип при аферезе представляет собой высокий процент CD8+ CD27+ CD45RO- Т-клеток (наивных или фенотипа TSCM). Плохим прогностическим фенотипом в продукте CTL019 является высокий процент PD1+ CAR+ и LAG3+ или TIM3+ Т-клеток (фенотип истощения).

На фиг.16 представлена иллюстративная блок-схема компьютерной системы, на которой можно практиковать различные аспекты и варианты осуществления.

На фиг.17 представлена иллюстративная тепловая карта, демонстрирующая бикластеризацию экспрессии цитокинов в стимулированных продуктах CTL019 и у пациентов с CLL. Два кластера (кластер 1 и кластер 3) практически исключительно состояли из CR и PR, в то время как другие два кластера (кластер 2 и кластер 4) содержали в основном NR. В среднем, уровни экспрессии цитокинов были более высокими у CR/PR против NR. На верхней панели показан красный канал изображения

тепловой карты, на центральной панели показан синий канал, а на нижней панели показан зеленый канал.

На фиг.18 представлены иллюстративные результаты логарифмически нормализованной экспрессии статистически значимых цитокинов (например, CCL20/ MIP3a, IL2, TNF $\alpha$ , IL17a и IL6) для различения пациентов CR, PR и NR при CLL.

На фиг.19А представлена иллюстративная диаграмма рассеяния, демонстрирующая логарифмически нормализованную корреляцию экспрессии IL17A (ось y) и CCL20 (ось x). Пунктирные линии соответствуют границе классификации для отделения NR от CR/PR. Каждая точка соответствует пациенту с CLL, и заштрихованная (NR), черная (PR) и белая (CR) области соответствуют клиническому ответу. Коэффициент корреляции обозначен как "r" (например, коэффициент корреляции 0,928) и соответствующее значение p для корреляции обозначено как "значение p" (например, соответствующее значению p 1,36e-09). На фиг.19В представлен иллюстративный график рассеяния, демонстрирующий корреляцию CCL20 с процентом CAR+ клеток, с коэффициентом корреляции 0,395 и соответствующим значением p 0,0761. Каждая точка соответствует пациенту CLL, и заштрихованная (NR), черная (PR) и белая (CR) области соответствуют клиническому ответу. Коэффициент корреляции обозначен как "r" (например, коэффициент корреляции 0,928) и соответствующее значение p для корреляции обозначено как "значение p". На фиг.19С представлена иллюстративная диаграмма рассеяния, демонстрирующая корреляцию IL17a с процентом CAR+ клеток, с коэффициентом корреляции 0,278 и соответствующим значением p 0,222. Каждая точка соответствует пациенту CLL, и заштрихованная (NR), черная (PR) и белая (CR) области соответствуют клиническому ответу. Коэффициент корреляции обозначен как "r" (например, коэффициент корреляции 0,928) и соответствующее значение p для корреляции обозначено как "значение p".

На фиг.20 представлены иллюстративные результаты (p=0,000215), иллюстрирующие, что гены T<sub>REG</sub> имеют высокие уровни экспрессии у пациентов с рецидивом (R) по сравнению с полностью отвечающими индивидуумами (CR) без рецидива. На оси x представлены образцы по группе ответа, где CR=полностью отвечающий индивидуум и R=индивидуум, у которого возник рецидив. На оси y представлены нормализованные показатели экспрессии метабенов.

На фиг.21 представлен иллюстративный график рассеяния, демонстрирующий процент CAR+ клеток (т.е. частоту трансдукции) до сбора клеток у полностью отвечающих индивидуумов (CR) белым цветом, частично отвечающих индивидуумов (PR) черным цветом и не отвечающих индивидуумов (NR) заштрихованной областью. Эффективность трансдукции определяли до сбора и сопоставляли с ответом индивидуума (например, CR, PR или NR). Сплошная линия соответствует эффективности трансдукции 15%, которая отделяет большинство не отвечающих индивидуумов от отвечающих индивидуумов. Без связи с конкретной теорией, эти данные указывают на то, что частота трансдукции CAR до сбора клеток является маркером ответа на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) при CLL.

На фиг.22 представлена столбиковая диаграмма, демонстрирующая взаимосвязь между инфузируемым количеством CD27+ PD1- CART-клеток и ответом на терапию.

На фиг.23 представлен график рассеяния, демонстрирующий взаимосвязь между инфузируемым количеством CD27+ PD1- CART-клеток и ответом на терапию.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают тем же значением, которое обычно подразумевает

специалист в области, к которой относится изобретение.

Форма единственного числа относится к одному или более чем к одному (т.е. по меньшей мере к одному) грамматическому объекту в форме единственного числа. В качестве примера "элемент" означает один элемент или более одного элемента.

5 Термин "приблизительно", когда он относится к поддающейся измерению величине, такой как количество, период времени и т.п., охватывает отклонения  $\pm 20\%$ , или в некоторых случаях  $\pm 10\%$ , или в некоторых случаях  $\pm 5\%$ , или в некоторых случаях  $\pm 1\%$ , или в некоторых случаях  $\pm 0,1\%$  от указанной величины, поскольку такие отклонения являются пригодными для выполнения описанных способов.

10 Термины "получать" или "получение", как используют в настоящем описании, относятся к получению во владение физического объекта (например, образца, полипептида, нуклеиновой кислоты или последовательности), или величины, например, числовой величины, путем "прямого получения" или "непрямого получения" физического объекта или величины. "Прямое получение" означает проведение процесса (например, 15 проведение способа синтеза или анализа) для получения физического объекта или величины. "Непрямое получение" относится к получению физического объекта или величины из другого объекта или источника (например, сторонней лаборатории, которая прямо получает физический объект или величину). Прямое получение физического объекта включает проведение процесса, который включает физическое изменение 20 физического вещества, например, исходного материала. Иллюстративные изменения включают получение физического объекта из двух или более исходных материалов, измельчение или фрагментацию вещества, разделение или очистку вещества, комбинирование двух или более отдельных объектов в смесь, проведение химической реакции, которая включает разрушение или формирование ковалентной или 25 нековалентной связи. Прямое получение величины включает проведение процесса, который включает физическое изменение образца или другого вещества, например, проведение аналитического процесса, который включает физическое изменение вещества, например, образца, анализируемого соединения или реагента (иногда называемого в 30 настоящем описании "физическим анализом"), проведение аналитического способа, например, способа, который включает одно или несколько из следующих: отделение или очистку вещества, например, анализируемого соединения, или его фрагмента или другого производного, от другого вещества; комбинирование анализируемого соединения, или его фрагмента или другого производного, с другим веществом, 35 например, буфером, растворителем или реагентом; или изменение структуры анализируемого соединения, или его фрагмента или другого производного, например, путем разрушения или образования ковалентной или нековалентной связи между первым и вторым атомами анализируемого соединения; или изменение структуры реагента, или его фрагмента или другого производного, например, путем разрушения и образования ковалентной или нековалентной связи между первым и вторым атомами 40 реагента.

Термин "антитело", как используют в рамках изобретения, относится к белку, или полипептидной последовательности, происходящим из молекулы иммуноглобулина, который специфически связываются с антигеном. Антитела могут быть 45 поликлональными или моноклональными, имеющими множество цепей или одноцепочечными, или интактными иммуноглобулинами, и они могут происходить из природных источников или из рекомбинантных источников. Антитела могут представлять собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов.

Термин "измененный уровень экспрессии" биомаркера, как описано в настоящем

описании (например, биомаркера, приведенного в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1 и генной сигнатуры клетки, экспрессирующей CAR против CD19 (например, Т-клетки, НК-клетки))  
 5 относится к увеличению (или снижению) уровня экспрессии маркера в исследуемом образце, таком как образец, полученный от пациента, страдающего злокачественной опухолью (например, гематологической злокачественной опухолью, такой как ALL и CLL), который превышает или является меньшим, чем стандартная ошибка анализа, используемого для оценки экспрессии. В некоторых вариантах осуществления изменение  
 10 может превышать или может быть меньше по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза, по меньшей мере в пять раз или по меньшей мере в двадцать раз или более, чем уровень экспрессии биомаркеров в контрольном образце (например, образце от здорового индивидуума, не имеющего ассоциированного с ними заболевания), или средний уровень экспрессии в нескольких  
 15 контрольных образцах. "Измененный уровень экспрессии" можно определять на уровне белка или нуклеиновой кислоты (например, мРНК).

Термин "фрагмент антитела" относится по меньшей мере к одной части антитела, которая сохраняет способность специфически взаимодействовать (например, путем связывания, пространственного препятствования, стабилизации/дестабилизации,  
 20 пространственного распределения) с эпитопом антигена. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv-фрагменты, фрагменты антител scFv, связанные дисульфидной связью Fv (sdFv), Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1, линейные антитела, однодоменные антитела, такие как sdAb (либо VL, либо VH), домены VHH животных семейства верблюжьих, мультиспецифические  
 25 антитела, образованные фрагментами антител, такими как двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, и выделенные CDR или другие связывающие эпитоп фрагменты антитела. Антигенсвязывающий фрагмент также может быть включен в однодоменные антитела, максиантитела, миниантитела, наноантитела, интраантитела, диантитела, триантитела,  
 30 тетраантитела, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005). Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть пересажены в каркасы на основе полипептидов, таких как фибронектин типа III (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описаны миниантитела на основе полипептида фибронектина).

35 Термин "scFv" относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, где вариабельные области легкой и тяжелой цепей связаны друг с другом, например через короткий гибкий полипептидный линкер, и способному экспрессироваться в качестве  
 40 одноцепочечного полипептида, и где scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он происходит. Если не указано, как используют в рамках изобретения, scFv может иметь вариабельные области VL и VH в любом порядке, например, относительно N-конца и C-конца полипептида scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

45 Термин "тяжелая цепь антитела" относится к более крупной из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антитела в их встречающихся в природе конформациях, и обычно определяющему класс, к которому относится антитело.



Термин "легкая цепь антитела" относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях. Легкие цепи каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ) относятся к двум основным изотипам легких цепей антител.

5 Термины "определяющая комплементарность область" и "CDR", как используют в рамках изобретения относятся к последовательностям аминокислот в переменных областях антитела, которые сообщают ему специфичность к антигену и аффинность связывания. Как правило, существует три CDR в каждой переменной области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три CDR в каждой переменной области легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3). Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR можно определять с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации "Kabat"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273,927-948 (схема нумерации "Chothia")  
10 или их комбинацию.  
15

Согласно схеме нумерации Kabat, в некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки CDR переменной домены тяжелой цепи (VH) нумеруются как 31-35 (HCDR1), 50-66 (HCDR2) и 99-109 (HCDR3); и аминокислотные остатки CDR в переменной домене легкой цепи (VL) нумеруются как 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2)  
20 и 89-97 (LCDR3). Согласно схеме нумерации Chothia, в некоторых вариантах осуществления аминокислоты CDR в VH нумеруются как 26-32 (HCDR1), 52-57 (HCDR2) и 99-109 (HCDR3); и аминокислотные остатки в VL нумеруются как 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). При комбинировании схем нумерации Kabat и Chothia, в некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют аминокислотным остаткам,  
25 которые являются частью CDR по Kabat, CDR по Chothia, или и тех, и других. Например, в некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют аминокислотным остаткам 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в VH, например, VH млекопитающих, например, VH человека; и аминокислотным остаткам 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в VL, например, VL млекопитающих, например, VL человека.  
30

Термин "противораковый эффект" относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными путями, включая, но не ограничиваясь ими, например, снижение объема опухоли, уменьшение количества злокачественных клеток, уменьшение количества метастазов, увеличение продолжительности жизни, снижение пролиферации злокачественных клеток, снижение выживаемости злокачественных клеток или смягчение  
35 различных физиологических симптомов, ассоциированных со злокачественным состоянием. "Противораковый эффект" также может проявляться способностью пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител к предупреждению возникновения злокачественной опухоли изначально. Термин "противоопухолевый эффект" относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными путями, включая,  
40 но не ограничиваясь ими, например, снижение объема опухоли, уменьшение количества опухолевых клеток, снижение пролиферации опухолевых клеток или снижение выживаемости опухолевых клеток.

Термин "аллогенный" относится к любому материалу, происходящему из другого животного того же вида относительно индивидуума, которому материал вводят. Два  
45 или более индивидуумов называют аллогенными друг другу, когда гены в одном или нескольких локусах не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенный материал от индивидуумов того же вида может быть достаточно генетически отличающимся, чтобы происходило антигенное взаимодействие.

Термин "аферез", как используют в рамках изобретения, относится к экстракорпоральному процессу, посредством которого кровь донора или пациента извлекают из донора или пациента и пропускают через устройство, которое отделяет конкретный компонент(ы) и возвращает остальную часть в кровоток донора или пациента, например, посредством ретрансфузии. Таким образом, в этом контексте "образец, полученный посредством афереза," относится к образцу, полученному с использованием афереза.

Термин "аутологичный" относится к любому материалу, происходящему из того же индивидуума, которому его впоследствии обратно вводят.

"Биомаркер" или "маркер" представляет собой ген, мРНК или белок, которые претерпевают изменение экспрессии, ассоциированное с прогрессированием злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) или способностью отвечать на лечение. Изменение может представлять собой изменение количества и/или активности в биологическом образце (например, образце крови, плазмы или сыворотки), полученном от индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, по сравнению с количеством и/или активностью в образце, полученном на исходном уровне, или предшествующей величиной у индивидуума, у индивидуума в другой период времени, средней или срединной величиной для популяции пациентов со злокачественной опухолью, здорового контроля, или популяции здоровых индивидуумов (например, контрольной); такие изменения экспрессии и/или активности ассоциированы со способностью индивидуума, имеющего злокачественное состояние (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как ALL и CLL), отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, CAR-экспрессирующими иммунными эффекторными клетками (например, CAR-экспрессирующими Т-клетками, НК-клетками)), например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19. Например, маркер по изобретению, который прогнозирует способность отвечать на терапевтические средства, может иметь измененный уровень экспрессии, уровень белка или активность белка в биологическом образце, полученном от индивидуума, имеющего или предположительно имеющего злокачественную опухоль, по сравнению с биологическим образцом, полученным от контрольного индивидуума.

Термин "злокачественная опухоль" относится к заболеванию, характеризующемуся неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Злокачественные клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части организма. Примеры различных злокачественных опухолей описаны в настоящем описании и включают, но не ограничиваются ими, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак почки, рак печени, злокачественную опухоль головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легкого и т.п. Злокачественные опухоли включают, но не ограничиваются ими, В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (В-ALL), Т-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (Т-ALL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический миелогенный лейкоз (СМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), В-клеточный промиелоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому,

миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмобластную лимфому, новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток и макроглобулинемию Вальденстрема. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль ассоциирована с экспрессией CD19. Термины "новообразование" и "злокачественная опухоль" используют в настоящем описании взаимозаменяемо, например, оба термина охватывают солидные и жидкостные опухоли. Как используют в рамках изобретения, термин "злокачественная опухоль" или "новообразование" включают предзлокачественные, а также злокачественные опухоли и новообразования.

Термины "ассоциированный со злокачественной опухолью антиген" или "опухолевый антиген" взаимозаменяемо относятся к молекуле (как правило, белок, углевод или липид), которая преимущественно экспрессируется на поверхности злокачественной клетки, либо полностью, либо в качестве фрагмента (например, МНС/пептид) по сравнению с нормальной клеткой, и которая является пригодной для предпочтительного нацеливания фармакологического средства на злокачественную клетку. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный со злокачественной опухолью антиген представляет собой маркер, экспрессируемый как нормальными клетками, так и злокачественными клетками, например, маркер линии дифференцировки, например, CD19 на В-клетках. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный со злокачественной опухолью антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, которая сверхэкспрессируется в злокачественной клетке по сравнению с нормальной клеткой, например, сверхэкспрессируется в 1 раз, сверхэкспрессируется в 2 раза, сверхэкспрессируется в 3 раза или более по сравнению с нормальной клеткой. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, которая ненадлежащим образом синтезируется в злокачественной клетке, например, молекулу, которая содержит делеции, вставки или мутации по сравнению с молекулой, экспрессируемой на нормальной клетке. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген экспрессируется исключительно на клеточной поверхности злокачественной клетки, полностью или в качестве фрагмента (например, МНС/пептида), и не синтезируется или не экспрессируется на поверхности нормальной клетки. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению включают CAR, содержащие антигенсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), который связывается с пептидом, презентруемым МНС. Обычно, пептиды, происходящие из эндогенных белков, занимают карманы молекул основного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I и распознаются Т-клеточными рецепторами (TCR) CD8+ Т-лимфоцитах. Комплексы МНС класса I конститутивно экспрессируются всеми ядродержащими клетками. При злокачественной опухоли вирусоспецифические и/или опухолеспецифические комплексы пептид/МНС представляют собой уникальный класс мишеней клеточной поверхности для иммунотерапии. Описаны пептиды, нацеливающие ТCR-подобные антитела, происходящие из вирусных или опухолевых антигенов, в контексте лейкоцитарного антигена человека (HLA)-A1 или HLA-A2 (см., например, Sastry et al., J Virol. 2011 85(5):1935-1942; Sergeeva et al., Blood, 2011 117(16):4262-4272; Verma et al., J Immunol 2010 184(4):2156-2165; Willemsen et al., Gene Ther 2001 8(21): 1601-1608; Dao et al., Sci Transl Med 2013 5(176): 176ra33; Tassev et al., Cancer Gene Ther 2012 19(2):84-100). Например, TCR-подобное антитело может быть идентифицировано при скрининге библиотеки, такой как библиотека фагового дисплея scFv человека.

Как используют в рамках изобретения, термин "CD19" относится к белку кластера

дифференцировки 19, который является антигенной детерминантой, поддающейся обнаружению на лейкозных клетках-предшественниках. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот человека и мыши могут быть найдены в общественной базе данных, такой как GenBank, UniProt и Swiss-Prot.

5 Например, аминокислотная последовательность CD19 человека может быть найдена в качестве номера доступа UniProt/Swiss-Prot № P15391, и нуклеотидная последовательность, кодирующая CD19 человека, может быть найдена под номером доступа № NM\_001178098. Как используют в рамках изобретения, "CD19" включает белки, содержащие мутации, например, точковые мутации, фрагменты, инсерции, делеции

10 и варианты по сплайсингу полноразмерного CD19 дикого типа. CD19 экспрессируется большинством злокачественных опухолей В-ростка, включая, например, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз и неходжкинскую лимфому. Другие клетки, которые экспрессируют CD19, представлены ниже в определении "заболевания, ассоциированного с экспрессией CD19". Также он является ранним

15 маркером предшественников В-клеток. См., например, Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997). В одном аспекте антигенсвязывающая часть CART распознает и связывает антиген во внеклеточном домене белка CD19. В одном аспекте белок CD19 экспрессируется на злокачественной клетке. В одном варианте осуществления CD19 имеет последовательность дикого типа, например, последовательность дикого типа

20 человека. В другом варианте осуществления CD19 имеет мутантную последовательность, например, мутантную последовательность человека.

Термин "химерный рецептор антигена" или альтернативно "CAR" относится к набору полипептидов, как правило, двум в наиболее простых вариантах осуществления, который, когда находится в иммунной эффекторной клетке, обеспечивает специфичность

25 клетки к клетке-мишени, как правило, злокачественной клетке, и индукцию внутриклеточного сигнала. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит по меньшей мере внутриклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен (также обозначаемый в настоящем описании как "внутриклеточный сигнальный домен"), содержащий функциональный сигнальный

30 домен, происходящий из стимулирующей молекулы и/или костимулирующей молекулы, как определено ниже. В некоторых вариантах осуществления набор полипептидов находится в одной полипептидной цепи (например, включает химерный слитый белок). В некоторых вариантах осуществления полипептиды в наборе не являются соседними друг с другом, например, находятся на различных полипептидных цепях. В некоторых

35 вариантах осуществления набор полипептидов включает переключатель димеризации, который в присутствии молекулы димеризации может связывать полипептиды друг с другом, например, может связывать антигенсвязывающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом. В одном аспекте стимулирующая молекула представляет собой зета-цепь, связанную с Т-клеточным рецепторным комплексом. В одном аспекте

40 цитоплазматический сигнальный домен включает первичный сигнальный домен (например, первичный сигнальный домен CD3-зета). В одном аспекте цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или несколько функциональных сигнальных доменов, происходящих из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, как определено ниже. В одном аспекте костимулирующая

45 молекула выбрана из 4-1BB (т.е. CD137), CD27, ICOS и/или CD28. В одном аспекте CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, происходящий из стимулирующей молекулы. В

одном аспекте CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, происходящий из костимулирующей молекулы, и функциональный сигнальный домен, происходящий из стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий два функциональных сигнальных домена, происходящих из одной или нескольких костимулирующей молекулы(молекул), и функциональный сигнальный домен, происходящий из стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий по меньшей мере два функциональных сигнальных домена, происходящих из одной или нескольких костимулирующей молекулы(молекул), и функциональный сигнальный домен, происходящий из стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR содержит необязательную лидерную последовательность на N-конце (N-ter) слитого белка CAR. В одном аспекте CAR дополнительно содержит лидерную последовательность на N-конце внеклеточного антигенраспознающего домена, где лидерная последовательность необязательно отщепляется от антигенраспознающего домена (например, scFv) в ходе клеточного процессинга и локализации CAR на клеточной мембране. В одном варианте осуществления CAR представляет собой CTL019.

Часть CAR по изобретению, содержащая антитело или фрагмент антитела, может существовать в различных формах, где антигенсвязывающий домен экспрессируется в качестве части непрерывной полипептидной цепи, включая, например, однодоменный фрагмент антитела (sdAb), одноцепочечное антитело (scFv) и гуманизованное антитело (Harlow et al., 1999: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). В одном аспекте антигенсвязывающий домен композиции CAR по изобретению содержит фрагмент антитела. В следующем аспекте CAR содержит фрагмент антитела, который содержит scFv.

Как используют в рамках изобретения, термин "связывающий домен" или "молекула антитела" относится к белку, например, цепи иммуноглобулина или ее фрагменту, содержащему по меньшей мере одну последовательность переменного домена иммуноглобулина. Термины "связывающий домен" или "молекула антитела" охватывают антитела и фрагменты антитела. В одном варианте осуществления молекула антитела представляет собой мультиспецифическую молекулу антитела, например, она содержит множество последовательностей переменных доменов иммуноглобулинов, где первая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, а вторая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления мультиспецифическая молекула антитела представляет собой биспецифическую молекулу антитела. Биспецифическое антитело обладает специфичностью в отношении не более чем двух антигенов. Биспецифическая молекула антитела характеризуется первой последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и второй последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает

специфичностью связывания в отношении второго эпитопа.

Часть CAR по изобретению, содержащая антитело или фрагмент антитела, может существовать в различных формах, где антигенсвязывающий домен экспрессируется в качестве части непрерывной полипептидной цепи, включая, например, однодоменный фрагмент антитела (sdAb), одноцепочечное антитело (scFv) и гуманизованное антитело (Harlow et al., 1999: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). В одном аспекте антигенсвязывающий домен композиции CAR по изобретению содержит фрагмент антитела. В следующем аспекте CAR содержит фрагмент антитела, который содержит scFv.

Выражение "заболевание, ассоциированное с экспрессией CD19," включает, но не ограничивается ими, заболевание, ассоциированное с экспрессией CD19 (например, CD19 дикого типа или мутантного CD19), или состояние, ассоциированное с клетками, которые экспрессируют или в какой-либо момент времени экспрессировали CD19, включая, например, пролиферативные заболевания, такие как злокачественная опухоль или новообразование, или предзлокачественное состояние, такое как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз; или не связанные со злокачественной опухолью состояния, ассоциированные с клетками, которые экспрессируют CD19. Во избежание неопределенности, заболевание, ассоциированное с экспрессией CD19, может включать состояние, ассоциированное с клетками, которые в настоящее время не экспрессируют CD19, например, поскольку экспрессия CD19 подавлена, например, вследствие лечения молекулой, нацеленной на CD19, например, CAR против CD19, но которая когда-то экспрессировала CD19. В одном аспекте злокачественная опухоль, ассоциированная с экспрессией CD19, представляет собой гематологическую злокачественную опухоль. В одном аспекте гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лейкоз или лимфому. В одном аспекте злокачественная опухоль, ассоциированная с экспрессией CD19, включает злокачественные опухоли и новообразования, включающие, но не ограничивающиеся ими, например, один или несколько из острых лейкозов, включая, но не ограничиваясь ими, например, острый миелоидный лейкоз (AML), В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз ("В-ALL"), Т-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз ("Т-ALL"), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL); один или несколько хронических лейкозов, включая, но не ограничиваясь ими, например, хронический миелогенный лейкоз (СМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (СLЛ). Дополнительные злокачественные опухоли или гематологические состояния, ассоциированные с экспрессией CD19, включают, но не ограничиваются ими, например, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмбластную лимфому, новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема, миелолипролиферативное новообразование; гистиоцитарное нарушение (например, нарушение тучных клеток или новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток); нарушение тучных клеток, например, системный мастоцитоз или лейкоз тучных клеток; В-клеточный

пролимфоцитарный лейкоз, плазмацитарную миелому и "предлейкоз", который представляет собой многообразную совокупность гематологических состояний, объединенных неэффективной продукцией (или дисплазией) миелоидных клеток крови, и т.п. Кроме того, заболевания, ассоциированные с экспрессией CD19, включают, но не ограничиваясь ими, например, атипичные и/или неклассические злокачественные опухоли, новообразования, предзлокачественные состояния или пролиферативные заболевания, ассоциированные с экспрессией CD19. Не связанные со злокачественной опухолью состояния, ассоциированные с экспрессией CD19, включают, но не ограничиваются ими, например, аутоиммунное заболевание (например, волчанка), воспалительные нарушения (аллергия и астма) и трансплантацию. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, экспрессируют или в какой-либо момент экспрессировали мРНК, кодирующую опухолевый антиген. В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, продуцируют белок опухолевого антигена (например, дикого типа или мутантный), и белок опухолевого антигена может присутствовать на нормальных уровнях или сниженных уровнях. В одном варианте осуществления экспрессирующие опухолевый антиген клетки продуцируют поддающиеся обнаружению уровни белка опухолевого антигена в один момент времени, а затем по существу не продуцируют поддающийся обнаружению белок опухолевого антигена. В других вариантах осуществления заболевание представляет собой отрицательную по CD19 злокачественную опухоль, например, отрицательную по CD19 рецидивирующую злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая опухолевый антиген (например, CD19), экспрессирует или в какой-либо момент времени экспрессировала мРНК, кодирующую опухолевый антиген. В одном варианте осуществления клетка, экспрессирующая опухолевый антиген (например, CD19), продуцирует опухолевый антигенный белок (например, дикого типа или мутантный), и белок опухолевого антигена может присутствовать на нормальных уровнях или на сниженных уровнях. В одном варианте осуществления клетка, экспрессирующая опухолевый антиген (например, CD19), продуцирует поддающиеся обнаружению уровни белка опухолевого антигена в один момент времени, а затем по существу не продуцирует белок опухолевого антигена.

Термин "костимулирующая молекула" относится к распознающему связывающему партнеру на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым, опосредуя костимулирующий ответ Т-клеткой, такой как, но не ограничиваясь ими, пролиферация. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от рецепторов антигенов или их лигандов, которые требуются для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие молекулы включают, но не ограничиваются ими, молекулу МНС класса I, белки рецепторов TNF, иммуноглобулин-подобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, VTFA, рецептор Toll-подобного лиганда, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KFRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VFA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKF, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM 1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55),

PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, и лиганд, который специфически связывается с CD83.

5 Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен относится к внутриклеточной части костимулирующей молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен может содержать всю внутриклеточную часть или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он происходит, или их функциональный фрагмент.

10 Как используют в рамках изобретения, "величина статуса ответа или рецидива" включает показатель (например, уровень), прогнозирующий способность индивидуума к ответу или рецидиву при лечении (например, лечении, которое включает или состоит из терапии CAR-экспрессирующими клетками, как описано в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления показатель является качественным или  
15 количественным. В некоторых вариантах осуществления величина статуса ответа или рецидива соответствует полностью отвечающему индивидууму, частично отвечающему индивидууму, не отвечающему индивидууму, индивидууму, у которого возникнет рецидив, или индивидууму, у которого не возникнет рецидива. В некоторых вариантах осуществления величина статуса ответа или рецидива представляет собой вероятность быть полностью отвечающим индивидуумом, частично отвечающим индивидуумом, не отвечающим индивидуумом, индивидуумом, у которого возникнет рецидив, или  
20 индивидуумом, у которого не возникнет рецидива. В некоторых вариантах осуществления величину статуса ответа или рецидива можно определять на основе любого из показателей (i)-(viii), как описано в настоящем описании.

Что касается способности к ответу, индивидуум отвечает на лечение, если параметр злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли,  
25 например, рост, пролиферация и/или выживаемость злокачественных клеток) замедляется или снижается на поддающуюся обнаружению величину, например, приблизительно на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более при определении с помощью любого подходящего показателя, например, массы, количества клеток или объема. В одном примере индивидуум отвечает на лечение, если индивидуум имеет  
30 увеличение продолжительности жизни приблизительно на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или более по сравнению с прогнозируемой продолжительностью жизни без проведения лечения. В другом примере индивидуум отвечает на лечение, если индивидуум имеет увеличенную выживаемость без заболевания, общую выживаемость или увеличенное время до прогрессирования.

35 Для определения того, отвечает ли пациент на лечение, можно использовать несколько способов, включая, например, критерии, предоставляемые Clinical Practice Guidelines in Oncology NCCN (NCCN Guidelines®). Например, в контексте B-ALL, полный ответ или полностью отвечающий индивидуум могут вовлекать одно или несколько из: < 5% бластов ВМ, >1000 нейтрофилов/ANC (/мкл), >100000 тромбоцитов (/мкл) без  
40 циркулирующих бластов или экстрамедулярного заболевания (нет лимфоаденопатии, спленомегалии, инфильтрации кожи/десны/тестикулярной массы/вовлечения ЦНС), гемопоэз трех ростков и отсутствие рецидива в течение 4 недель. Частично отвечающий индивидуум может вовлекать одно или несколько из >50% снижения бластов ВМ, >1000 нейтрофилов/ANC (/мкл), >100000 тромбоцитов (/мкл). Не отвечающий индивидуум  
45 может демонстрировать прогрессирование заболевания, например, > 25% бластов ВМ.

"Полностью отвечающий", как используют в рамках изобретения, относится к индивидууму, имеющему заболевание, например, злокачественную опухоль, который проявляет полный ответ на лечение, например полную ремиссию. Полный ответ можно



идентифицировать, например, с использованием NCCN Guidelines® или критериев Cheson et al, J Clin Oncol 17:1244 (1999) и Cheson et al., "Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma", J Clin Oncol 25:579-586 (2007) (оба из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме), как описано в настоящем описании.

5 "Частично отвечающий", как используют в рамках изобретения, относится к индивидууму, имеющему заболевание, например, злокачественную опухоль, который проявляет частичный ответ на лечение, например, частичную ремиссию. Частичный ответ можно идентифицировать, например, с использованием NCCN Guidelines® или критериев Cheson, как описано в настоящем описании.

10 "Не отвечающий", как используют в рамках изобретения, относится к индивидууму, имеющему заболевание, например, злокачественную опухоль, который не проявляет ответ на лечение, например, пациент имеет стабильное заболевание или прогрессирующее заболевание. Не отвечающего индивидуума можно идентифицировать, например, с использованием NCCN Guidelines® или критериев Cheson, как описано в настоящем  
15 описании.

Термин "рецидив", как используют в рамках изобретения, относится к повторному возникновению заболевания (например, злокачественной опухоли) после первоначального периода ответа, например, после предшествующей терапии, например, терапии злокачественной опухоли (например, полного ответа или частичного ответа).  
20 Первоначальный период ответа может вовлекать уровень злокачественных клеток, падающий ниже определенного порога, например, ниже 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. Повторное возникновение может вовлекать уровень злокачественных клеток, достигающий величины выше определенного порогового уровня, например, выше 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. Например, в контексте B-ALL, повторное  
25 возникновение может вовлекать, например, повторное возникновение бластов в крови, костном мозге (> 5%) или любой экстрамедуллярной области после полного ответа. В этом контексте полный ответ может вовлекать <5% бластов ВМ. Более часто, в одном варианте осуществления ответ (например, полный ответ или частичный ответ) может вовлекать отсутствие поддающейся обнаружению MRD (минимальная резидуальная  
30 болезнь). В одном варианте осуществления первоначальный период ответа длится по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 суток; по меньшей мере 1, 2, 3 или 4 недели; по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет.

В некоторых вариантах осуществления при терапии, которая включает ингибитор CD19, например, терапии CAR против CD19, может возникнуть рецидив или  
35 рефрактерность к лечению. Рецидив или резистентность могут быть вызваны утратой CD19 (например, мутацией с утратой антигена) или другим изменением CD19, которое снижает уровень CD19 (например, вызванным клоной селекцией CD19-отрицательных клонов). Злокачественную опухоль, которая имеет такую утрату или изменение CD19, называют в настоящем описании "CD19-отрицательной  
40 злокачественной опухолью" или "CD19-отрицательной рецидивирующей злокачественной опухолью"). Должно быть понятно, что CD19-отрицательная злокачественная опухоль не должна иметь 100% утрату CD19, а должна иметь достаточное снижение для уменьшения эффективности терапии против CD19, так что происходит рецидив злокачественной опухоли или она становится рефрактерной. В некоторых вариантах  
45 осуществления CD19-отрицательная злокачественная опухоль является результатом терапии CAR против CD19. В некоторых вариантах осуществления CD19-отрицательную множественную миелому можно лечить с помощью терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, например, как описано в PCT/US2015/024671,

поданной 7 апреля 2015 года (например, абзацы 9 и 90, и пример 6 в ней), которая включена в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления CD19-отрицательную злокачественную опухоль можно лечить с помощью терапии CAR-экспрессирующими клетками, например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD123, например, как описано в PCT/US2015/045898, поданной 19 августа 2015 года (например, стр.26, стр.30, и пример 7 в ней), которая включена в качестве ссылки в полном объеме.

Термин "эндогенный" относится к любому материалу из или продуцируемому внутри организма, клетки, ткани или системы.

Термины "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к количеству соединения, состава, материала или композиции, как описано в настоящем описании, эффективному для достижения конкретного биологического результата.

Термин "экзогенный" относится к любому материалу, внесенному извне или продуцированному вне организма, клетки, ткани или системы.

Термин "экспрессия" относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности, запускаемой промотором.

Термины "гибкий полипептидный линкер" или "линкер", как используют в контексте scFv, относится к пептидному линкеру, который состоит из аминокислот, таких как остатки глицина и/или серина, используемых отдельно или в комбинации, для связывания вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи вместе. В одном варианте осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой линкер Gly/Ser, и он содержит аминокислотную последовательность  $(\text{Gly-Gly-Gly-Ser})_n$ , где n представляет собой положительное целое число, равное или превышающее 1.

Например, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5 и n=6, n=7, n=8, n=9 и n=10 (SEQ ID NO: 28). В одном варианте осуществления гибкие полипептидные линкеры включают, но не ограничиваются ими,  $(\text{Gly}_4 \text{Ser})_4$  (SEQ ID NO: 29) или  $(\text{Gly}_4 \text{Ser})_3$  (SEQ ID NO: 30). В другом варианте осуществления линкеры включают множество повторов  $(\text{Gly}_2 \text{Ser})$ ,  $(\text{GlySer})$  или  $(\text{Gly}_3 \text{Ser})$  (SEQ ID NO: 31). Также в объем изобретения входят линкеры, описанные в WO2012/138475, включенной в настоящее описание в качестве ссылки).

Термины "гомология" или "идентичность", используемые в настоящем описании взаимозаменяемо, относятся к сходству двух полинуклеотидных последовательностей или двух полипептидных последовательностей, причем идентичность является более строгим сравнением. Выражения "процентная идентичность или гомология" и "% идентичность или гомология" относятся к проценту сходства последовательностей при сравнении двух или более полинуклеотидных последовательностей или двух или более полипептидных последовательностей. "Сходство последовательностей" относится к процентному сходству последовательностей пар оснований (при определении любым подходящим способом) между двумя или более полинуклеотидными последовательностями. Две или более последовательности могут обладать любым сходством в пределах 0-100%, или любого целого числа между ними. Идентичность или сходство можно определять путем сравнения положения в каждой последовательности, которое может быть выровнено для целей сравнения. Когда положение в сравниваемых последовательностях занято одним и тем же нуклеотидным основанием или аминокислотой, тогда молекулы являются идентичными в этом положении. Степень сходства или идентичность полинуклеотидных последовательностей является функцией количества идентичных или совпадающих нуклеотидов в общих положениях

полинуклеотидных последовательностей. Степень идентичности полипептидных последовательностей является функцией идентичных аминокислот в общих положениях полипептидных последовательностей. Степень гомологии или сходства полипептидных последовательностей является функцией количества аминокислот в общих положениях полипептидных последовательностях. Термин "существенная гомология", как используют в рамках изобретения, относится к гомологии по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более.

"Гуманизированные" формы не являющихся человеческими антител (например, мыши) представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или другие связывающие антиген подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, происходящую из не являющегося человеческим иммуноглобулина. В основном гуманизированные антитела и их фрагменты представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело или фрагмент антитела), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента заменены остатками из CDR не являющегося человеком вида (донорное антитело), такого как мышь, крыса или кролик, имеющими желаемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых случаях остатки каркасной области Fv (FR) иммуноглобулина человека заменены соответствующими не являющимися человеческими остатками. Более того, гуманизированное антитело/фрагмент антитела может содержать остатки, которые не встречаются ни в реципиентном антителе, ни в импортированных последовательностях CDR или каркасной области. Эти модификации могут далее усовершенствовать и оптимизировать эффективность антитела или фрагмента антитела. Как правило, гуманизированное антитело или его фрагмент содержат значительную часть по меньшей мере одного, и, как правило, двух, вариабельных доменов, в которых все или по существу все из областей CDR соответствуют областям CDR не являющегося человеческим иммуноглобулина и все или по существу все из областей FR представляют собой области FR из последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело или фрагмент антитела также могут содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Для более подробного описания, см. Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

"Иммунная эффекторная клетка", как этот термин используют в настоящем описании, относится к клетке, которая вовлечена в иммунный ответ, например, стимуляцию иммунного эффекторного ответа. Примеры иммунных эффекторных клеток включают Т-клетки, например, альфа/бета Т-клетки и гамма/дельта Т-клетки, В-клетки, натуральные киллеры (NK), натуральные киллерные Т-клетки (NK-Т), тучные клетки и фагоциты миелоидного происхождения.

"Иммунная эффекторная функция или иммунный эффекторный ответ", как эти термины используют в настоящем описании, относятся к функции или ответу, например, иммунной эффекторной клетки, которая усиливает или стимулирует иммунную атаку клетки-мишени. Например, иммунная эффекторная функция или ответ относятся к свойству Т-клеток или NK-клеток, которое стимулирует уничтожение или ингибирование роста или пролиферации клетки-мишени. В случае Т-клетки, примерами иммунной эффекторной функции или ответа являются первичная стимуляция и костимуляция.

Термин "эффекторная функция" относится к специализированной функции клетки.

Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, включая секрецию цитокинов.

Термин "4-1BB" относится к представителю суперсемейства TNFR с аминокислотной последовательностью, представленной в качестве последовательности с номером доступа GenBank № AAA62478.2, или эквивалентными остатками из не являющегося человеком вида, например, мыши, грызуна, мартышки, человекообразной обезьяны и т.п. В одном аспекте "костимулирующий домен 4-1BB" определяют как аминокислотные остатки 214-255 последовательности с номером доступа GenBank № AAA62478.2, или эквивалентные остатки из не являющегося человеком вида, например, мыши, грызуна, мартышки, человекообразной обезьяны и т.п. В одном аспекте "костимулирующий домен 4-1BB" представляет собой последовательность, представленную в качестве SEQ ID NO: 7, или эквивалентные остатки из не являющегося человеком вида, например, мыши, грызуна, мартышки, человекообразной обезьяны и т.п.

"Внутриклеточный сигнальный домен", как используют в настоящем описании, относится к внутриклеточной части молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который стимулирует иммунную эффекторную функцию содержащей CAR клетки, например, CAR-экспрессирующей клетки, например, Т-клетки или NK-клетки. Примеры иммунной эффекторной функции, например, в CAR-экспрессирующей клетке, включают цитолитическую активность и хелперную активность, включая секрецию цитокинов. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя можно использовать целый внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях не является необходимым использование целой цепи. В случаях когда используют укороченную часть внутриклеточного сигнального домена такую укороченную часть можно использовать вместо интактной цепи при условии, что она передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, подразумевают, что термин "внутриклеточный сигнальный домен" включает любую укороченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. Иллюстративные первичные внутриклеточные сигнальные домены включают домены, происходящие из молекул, ответственных за первичную стимуляцию или антигензависимую стимуляцию. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костисмулирующий внутриклеточный домен. Иллюстративные костисмулирующие внутриклеточные сигнальные домены включают домены, происходящие из молекул, ответственных за костисмулирующие сигналы или антиген-независимую стимуляцию. Например, в случае CAR-экспрессирующей клетки (например, Т-клетки, NK-клетки) первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность Т-клеточного рецептора, и костисмулирующий внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность из корецептора или костисмулирующей молекулы.

Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Примеры содержащих ITAM первичных цитоплазматических сигнальных последовательностей включают, но не ограничиваются ими, последовательности, происходящие из CD3-зета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 ("ICOS"), FcεRI, CD66d, CD32, DAP10 и DAP12.

Как используют в рамках изобретения, "транскрибированная *in vitro* РНК" относится к РНК, предпочтительно мРНК, синтезированной *in vitro*. Как правило, транскрибированную *in vitro* РНК получают из вектора для транскрипции *in vitro*. Вектор для транскрипции *in vitro* содержит матрицу, которую используют для получения

5

транскрибированной *in vitro* РНК. Термин "выделенный" означает измененный или извлеченный относительно природного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественным образом присутствующие в живом животном, не являются "выделенными", но те же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от

10

сосуществующих с ними материалов природного состояния, являются "выделенными". Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в ненативной среде, например, такой как клетка-хозяин. Термин "лентивирус" относится к роду семейства Retroviridae. Лентивирусы являются

15

уникальными среди ретровирусов, поскольку они способны инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, так что они являются одним из наиболее эффективных способов доставки вектора с геном. Примерами лентивирусов являются ВИЧ, SIV и FIV. Термин "лентивирусный вектор" относится к вектору, происходящему по меньшей

20

мере из части генома лентивируса, включая, а частности, самоинактивирующийся лентивирусный вектор, представленный в Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Другие примеры лентивирусных векторов, которые можно использовать в клинике, включают, но не ограничиваются ими, например, технологию доставки генов LENTIVECTOR® от Oxford BioMedica, векторную систему LENTIMAX™ от Lentigen и

25

т.п. Также доступны неклинические типы лентивирусных векторов, и они известны специалисту в данной области. Термин "низкая усиливающая иммунитет доза", когда его используют применительно к ингибитору mTOR, например, аллостерическому ингибитору mTOR, например RAD001 или рапамицину, или каталитическому ингибитору mTOR, относится к дозе ингибитора

30

mTOR, которая частично, но не полностью ингибирует активность mTOR, например, при измерении по ингибированию активности киназы P70 S6. Способы оценки активности mTOR, например, по ингибированию киназы P70 S6, описаны в настоящем описании. Доза является недостаточной для обеспечения полного подавления иммунного

35

ответа, но является достаточной для усиления иммунного ответа. В одном варианте осуществления низкая усиливающая иммунитет доза ингибитора mTOR приводит к уменьшению количества положительных по PD-1 иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или НК-клеток, и/или увеличению количества отрицательных по PD-1 иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или НК-клеток, или к увеличению соотношения отрицательные по PD-1 иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки или НК-клетки/положительные по PD-1 иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки или НК-клетки. Как правило, термин "наивная Т-клетка" относится к иммунным клеткам, которые

45

включают клетки, не подвергавшиеся воздействию антигена, например, иммунные клетки, которые являются предшественниками клеток памяти. В некоторых вариантах осуществления наивные Т-клетки могут быть дифференцированными, но еще не встретившими распознаваемый ими антиген, и, таким образом, они являются активированными Т-клетками или Т-клетками памяти. В некоторых вариантах осуществления наивные Т-клетки могут характеризоваться экспрессией CD62L, CD27,

CCR7, CD45RA, CD28 и CD127, и отсутствием изоформы CD95 или CD45RO. В определенных вариантах осуществления наивные Т-клетки представляют собой тип более молодых Т-клеток, как описано в настоящем описании.

5 Термин "менее истощенный" или "менее истощенный фенотип" относится к иммунным эффекторным клеткам, которые имеют сниженную (например, отсутствие) экспрессию маркеров истощения иммунных клеток, например, PD1, TIM3 и LAG3. В некоторых вариантах осуществления менее истощенная клетка может представлять собой более молодую Т-клетку, как описано в настоящем описании.

10 Термины "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относятся к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК), или комбинации ДНК или РНК, и их полимерам либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. Термин "нуклеиновая кислота" включает ген, кДНК или мРНК. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты является синтетической (например, химически синтезированной) или рекомбинантной. Если конкретно не  
15 ограничено, термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые имеют сходные свойства связывания с эталонной нуклеиновой кислотой и метаболизируются аналогично встречающимся в природе нуклеотидам. Если нет иных указаний, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также косвенно охватывает ее консервативно модифицированные варианты  
20 (например, вырожденные замены кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также последовательность, прямо указанную. В частности, вырожденные замены кодонов можно осуществлять путем получения последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов замещено смешанными остатками и/или остатками дезоксиинозина  
25 (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)). В контексте настоящего изобретения используют следующие сокращения часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот. "А" относится к аденозину, "С" относится к цитозину, "G" относится к гуанозину, "Т" относится к тимидину и "U" относится к уридину.

30 "Маркер" или "биомаркер" "нуклеиновой кислоты" представляет собой нуклеиновую кислоту (например, ДНК, мРНК, кДНК), кодируемую маркером или соответствующую маркеру, как описано в настоящем описании. Например, такие маркерные молекулы нуклеиновой кислоты включают ДНК (например, геномную ДНК и кДНК), содержащую целую или частичную последовательность любой из указанных последовательностей  
35 нуклеиновых кислот, или комплементарную последовательность или гибридизующийся фрагмент такой последовательности. Маркерные молекулы нуклеиновых кислот также включают РНК, содержащую целую или частичную последовательность любой из последовательностей нуклеиновых кислот, указанных в настоящем описании, или комплементарную последовательность для такой последовательности, где все остатки  
40 тимидина заменены остатками уридина. "Маркерный белок" представляет собой белок, кодируемый маркером или соответствующий маркеру по изобретению. Маркерный белок содержит целую или неполную последовательность белка, кодируемого любыми из последовательностей, указанных в настоящем описании, или их фрагментами.

Термины "белок" и "полипептид" используют в настоящем описании взаимозаменяемо.  
45 "Сверхэкспрессия" или "значительно более высокий уровень экспрессии" генных продуктов относится к уровню экспрессии или количеству копий в исследуемом образце, которые превышают стандартную ошибку анализа, используемого для оценки уровня экспрессии. В некоторых вариантах осуществления сверхэкспрессия может по меньшей

мере в два, по меньшей мере в три, по меньшей мере в четыре, по меньшей мере в пять или по меньшей мере в десять или более раз превышать уровень экспрессии гена в контрольном образце или средний уровень экспрессии генных продуктов в нескольких контрольных образцах.

5 Термины "пептид," "полипептид" и "белок" используют взаимозаменяемо, и они относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должны содержать по меньшей мере две аминокислоты, и отсутствует ограничение на максимальное количество аминокислот, которые могут содержаться в последовательности белка или пептида. Полипептиды  
10 включают любой пептид или белок, содержащие две или более аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями. Как используют в рамках изобретения, термин относится к как коротким цепям, которые также обычно называют в данной области, например, пептидами, олигопептидами и олигомерами, так и к более длинным цепям, которые обычно называют в данной области белками, для которых существует  
15 множество типов. "Полипептиды" включают, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитые белки, среди прочих. Полипептид включает природный пептид, рекомбинантный пептид, рекомбинантный пептид или их комбинацию.

20 Как используют в рамках изобретения, "поли(А)" представляет собой серию остатков аденозина, присоединяемых к мРНК посредством полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления конструкции для временной экспрессии длина поли-А составляет от 50 до 5000 (SEQ ID NO: 34) (например, 2000; SEQ ID NO: 32), например, 64 (SEQ ID NO: 37), например, более 100 (например, 150, SEQ ID NO: 33), например,  
25 более 400 (SEQ ID NO: 38). Последовательности поли(А) могут быть химически или ферментативно модифицированы для модулирования функциональности мРНК, такой как локализация, стабильность или эффективность трансляции.

Термин "зонд" относится к любой молекуле, которая способна селективно связываться с конкретной молекулой-мишенью, например, маркером по изобретению.  
30 Зонды могут быть либо синтезированы специалистом в данной области, либо происходят из соответствующих биологических препаратов. Для обнаружения молекулы-мишени зонды могут быть специально сконструированы так, чтобы быть мечеными, как описано в настоящем описании. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают, но не ограничиваются ими, РНК, ДНК, белки, антитела и  
35 органические мономеры.

Термин "промотор" относится к последовательности ДНК, распознаваемой синтетическим аппаратом клетки или введенным синтетическим аппаратом, которая требуется для инициации транскрипции полинуклеотидной последовательности.

Термин "промоторная/регуляторная последовательность" относится к  
40 последовательности нуклеиновой кислоты, которая требуется для экспрессии продукта гена, функционально связанного с промоторной/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может представлять собой основную промоторную последовательность и в других случаях эта последовательность также может включать энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы,  
45 которые требуются для экспрессии продукта гена. Промоторная/регуляторная последовательность, например, может представлять собой последовательность, которая экспрессирует продукт гена тканеспецифическим образом.

Термин "профилактика", как используют в рамках изобретения, означает

предупреждение или защитное лечение заболевания или болезненного состояния.

5 Диапазоны: на протяжении настоящего описания различные аспекты изобретения могут быть представлены в формате диапазонов. Следует понимать, что описание в формате диапазонов предоставлено только для удобства и краткости, и его не следует  
5 истолковывать как строгое ограничение объема изобретения. Таким образом, описание диапазона следует считать имеющим конкретно описанные все возможные числовые поддиапазоны, а также индивидуальные числовые величины в этом диапазоне.

10 Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует истолковывать как диапазон, имеющий конкретно описанные поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до  
10 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также индивидуальные числа в этом диапазоне, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. В качестве другого примера диапазон, такой как идентичность 95-99%, включает что-либо с 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью и включает поддиапазоны, такие как идентичность 96-99%, 96-98%, 96-  
15 97%, 97-99%, 97-98% и 98-99%. Это применимо независимо от ширины диапазона.

15 Термин "рекомбинантное антитело" относится к антителу, которое получают с использованием технологии рекомбинантных ДНК, например, такому как антитело, экспрессируемое бактериофагом или дрожжевой экспрессирующей системой. Термин также следует истолковывать как антитело, полученное посредством синтеза молекулы  
20 ДНК, кодирующей антитело, причем эта молекула ДНК экспрессирует белок антитела или аминокислотную последовательность, характеризующую антитело, где ДНК или аминокислотная последовательность получены с использованием технологии рекомбинантных ДНК или аминокислотных последовательностей, которая доступна и хорошо известна в данной области.

25 "Рефрактерный", как используют в рамках изобретения, относится к заболеванию, например, злокачественной опухоли, которое не отвечает на лечение. В некоторых вариантах осуществления рефрактерная злокачественная опухоль может быть устойчивой к лечению до или в начале лечения. В других вариантах осуществления рефрактерная злокачественная опухоль может стать рефрактерной в процессе лечения. Рефрактерную злокачественную опухоль также называют резистентной злокачественной  
30 опухолью.

В некоторых вариантах осуществления эталонный или контрольный уровень или активность представляет собой уровень и/или активность у индивидуума, например, в образце, полученном из одного или нескольких из: исходного уровня или предшествующей величины для индивидуума (например, до лечения CAR-  
35 экспрессирующей клеткой); индивидуума в другой период времени; средней или срединной величины для популяции пациентов со злокачественной опухолью; здорового контроля или здоровой популяции индивидуумов (например, контроля).

"Образец", "образец ткани", "образец от пациента", "образец клеток или ткани пациента" или "проба" относятся к биологическому образцу, полученному из ткани  
40 или жидкости организма индивидуума или пациента. Источником образца ткани может быть солидная ткань, такая как из свежего, замороженного и/или сохраненного органа, образец ткани, биоптат или аспират; кровь или компоненты крови (например, сыворотка, плазма); жидкости организма, такие как моча, спинномозговая жидкость, цельная кровь, плазма и сыворотка. Образец может включать неклеточную фракцию (например,  
45 моча, плазма, сыворотка или другая неклеточная жидкость организма). В одном варианте осуществления образец представляет собой образец мочи. В других вариантах осуществления жидкость организма, из которой получают образец индивидуума, включает кровь (например, цельную кровь). В одном варианте осуществления образец



представляет собой образец цельной крови, полученный от индивидуума. В определенных вариантах осуществления кровь можно далее обрабатывать для получения плазмы или сыворотки. В одном варианте осуществления образец представляет собой образец, полученный посредством афереза крови индивидуума. В 5 одном варианте осуществления образец представляет собой образец произведенного продукта, например, модифицированных способом инженерии Т-клеток, полученных из крови индивидуума, например, произведенного продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), например, произведенного продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19. В другом варианте осуществления образец 10 содержит ткань, клетки (например, моноклеарные клетки периферической крови (РВМС)). Например, образец может представлять собой образец, полученный посредством тонкоигольной пункционной биопсии, архивный образец (например, архивный образец с известным диагнозом и/или анамнезом лечения), гистологический срез (например, замороженный или фиксированный формалином срез, например, после 15 длительного хранения), среди прочих. Термин "образец" включает любой материал, полученный и/или происходящий из биологического образца, включая полипептид и нуклеиновую кислоту (например, геномную ДНК, кДНК, РНК), очищенные или переработанные из образца. Очистка и/или переработка образца могут вовлекать одно или несколько из экстрагирования, концентрирования, выделения антитела, сортировки, 20 концентрирования, фиксации, добавления реагентов и т.п. Образец может содержать соединения, которые в природе не смешаны с тканью, такие как консерванты, антикоагулянты, буферы, фиксажи, питательные вещества, антибиотики и т.п.

Термин "продукт" или "произведенный продукт", как используют в рамках изобретения, относится к произведенной композиции, содержащей модифицированную 25 способами генной инженерии клетку (например, иммунную эффекторную клетку), например, популяцию клеток, в которой множество клеток модифицированы способами инженерии для экспрессии CAR, например, CAR, описанного в настоящем описании. Произведенный продукт может представлять собой любую модифицированную 30 способами генной инженерии эффекторную клетку (например, Т-клетку, НК-клетку), например, модифицированные способами генной инженерии иммунные эффекторные клетки, полученные из крови индивидуума, например, произведенный продукт CAR-экспрессирующих клеток, например, произведенный продукт клеток, экспрессирующих CAR против CD19. В одном варианте осуществления клетку (например, иммунную 35 эффекторную клетку), модифицированную способами инженерии для экспрессии CAR, можно получать из активированной криоконсервированной увеличенной в количестве клеточной популяции (например, увеличенной в количестве популяции иммунных эффекторных клеток).

Термин "сигнальный домен" относится к функциональной части белка, которая действует, передавая информацию в клетке для регуляции клеточной активности через 40 определенные пути передачи сигнала путем образования вторичных посредников или функционирования в качестве эффекторов посредством ответа на таких посредников.

Количество биомаркера, например, продукта экспрессии гена (например, одного или нескольких биомаркеров, описанных в настоящем описании) у индивидуума является "значимо" более высоким или более низким, чем нормальное количество маркера, если 45 количество маркера превышает или является более низким, соответственно, чем нормальный уровень на количество, превышающее стандартную ошибку анализа, используемого для оценки количества, или по меньшей мере в два, три, четыре, пять, десять или более превышающее это количество. Альтернативно количество маркера

у индивидуума можно считать "значимо" более высоким или более низким, чем нормальное количество, если количество по меньшей мере приблизительно в 1,5, два, по меньшей мере приблизительно три, по меньшей мере приблизительно четыре, или по меньшей мере приблизительно пять раз превышает или является более низким, соответственно, чем нормальное количество маркера.

Термин "специфически связывается" относится к антителу или лиганду, которые распознают и связываются с белком-партнером по связыванию, присутствующем в образце, но при этом эти антитело или лиганд по существу не распознают или не связывают другие молекулы в образце.

Термин "стимуляция" относится к первичному ответу, индуцированному посредством связывания стимулирующей молекулы (например, комплекс TCR/CD3) с ее собственным лигандом, что, тем самым, опосредует событие передачи сигнала, такое как, но не ограничиваясь ими, передача сигнала через комплекс TCR/CD3 или передача сигнала через соответствующий рецептор NK или сигнальные домены CAR. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул, такую как подавление регуляции TGF- $\beta$  и/или реорганизация структур цитоскелета и т.п.

Термин "стимулирующая молекула" относится к молекуле, экспрессируемой Т-клеткой, которая предоставляет первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность(и), которая регулирует первичную активацию комплекса TCR стимулирующим образом для по меньшей мере некоторого аспекта каскада передачи сигнала Т-клетками. В одном аспекте первичный сигнал инициируется, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, нагруженной пептидом, и который приводит к опосредованию Т-клеточного ответа, включая, но не ограничиваясь ими, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Первичная цитоплазматическая сигнальная последовательность (также обозначаемая как "первичный сигнальный домен"), которая действует стимулирующим образом, может содержать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Примеры содержащей ITAM цитоплазматической сигнальной последовательности, которая является особенно пригодной в рамках изобретения, включают, но не ограничиваются ими, последовательности, происходящие из CD3-зета, общего FcR-гамма (FCER1G), Fc-гамма RIIa, FcR-бета (Fc-эпсилон R1b), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD79a, CD79b, DAP10 и DAP12. В конкретном CAR по изобретению внутриклеточный сигнальный домен в любом одном или нескольких CAR по изобретению содержит внутриклеточную сигнальную последовательность, например, первичную сигнальную последовательность CD3-зета. В конкретном CAR по изобретению первичная сигнальная последовательность CD3-зета представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 (мутантный CD3-зета), или эквивалентные остатки из не являющегося человеком вида, например, мыши, грызуна, мартышки, человекообразной обезьяны и т.п. В конкретном CAR по изобретению первичная сигнальная последовательность CD3-зета представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20 (CD3-зета человека дикого типа), или эквивалентные остатки из не являющегося человеком вида, например, мыши, грызуна, мартышки, человекообразной обезьяны и т.п.

Термин "индивидуум" включает живые организмы, у которых может быть индуцирован иммунный ответ (например, млекопитающие, человек). В одном варианте осуществления индивидуумом является млекопитающее. В одном варианте осуществления индивидуумом является человек. В одном варианте осуществления индивидуумом является пациент.

Термин "терапевтический", как используют в рамках изобретения, означает лечение. Терапевтический эффект достигают путем снижения, подавления, обеспечения ремиссии или устранения болезненного состояния.

5 Термины "трансфицированный", или "трансформированный", или "трансдуцированный" относятся к процессу, посредством которого экзогенная нуклеиновая кислота переносится или вводится в клетку-хозяина. "Трансфицированная", или "трансформированная", или "трансдуцированная" клетка представляет собой клетку, которая трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную клетку индивидуума и ее потомство.

10 Как используют в рамках изобретения, "временный" относится к экспрессии невстроенного трансгена в течение периода, составляющего несколько часов, суток или недель, где период экспрессии является меньшим, чем период экспрессии гена, если он встроен в геном или содержится в стабильном плазмидном репликоне в клетке-хозяине.

15 Термин "трансмембранный домен" относится к полипептиду, который проходит через плазматическую мембрану. В одном варианте осуществления он связывает внеклеточную последовательность, например, домен переключения, внеклеточный распознающий элемент, например, антигенсвязывающий домен, ингибиторный противодействующий лигандсвязывающий домен или костимулирующий домен ECD, с внутриклеточной последовательностью, например, с доменом переключения или внутриклеточным сигнальным доменом. Трансмембранный домен может включать одну или несколько дополнительных аминокислот, соседних с трансмембранной областью, например, одну или несколько аминокислот, ассоциированных с внеклеточной областью белка, из которого происходит трансмембранный домен (например, 1, 2, 3, 25 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и вплоть до 15 аминокислот внеклеточной области) и/или одну или несколько дополнительных аминокислот, ассоциированных с внутриклеточной областью белка, из которого происходит трансмембранный белок (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и вплоть до 15 аминокислот внутриклеточной области). Примеры трансмембранных доменов описаны в настоящем описании.

30 Термины "лечить", "лечение" и "проведение лечения" относятся к снижению или смягчению прогрессирования, тяжести и/или длительности пролиферативного нарушения, или к смягчению одного или нескольких симптомов (предпочтительно, одного или нескольких различных симптомов) пролиферативного нарушения вследствие проведения одной или нескольких терапий (например, введения одного или 35 нескольких лекарственных средств, таких как CAR по изобретению). В конкретных вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "проведение лечения" относятся к смягчению по меньшей мере одного поддающегося измерению физического параметра пролиферативного нарушения, такого как рост опухоли, не обязательно заметного для пациента. В других вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "проведение 40 лечения" относятся к ингибированию прогрессирования пролиферативного нарушения, либо физически, например, путем стабилизации различного симптома, либо физиологически, например, путем стабилизации физического параметра, или обоими путями. В других вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "проведение лечения" относятся к снижению или стабилизации размера опухоли или количества 45 злокачественных клеток.

"Недостаточная экспрессия" или "значительно сниженный уровень экспрессии" продуктов (например, маркеров, описанных в настоящем описании) относится к уровню экспрессии в исследуемом образце, который превышает стандартную ошибку анализа,

используемого для оценки экспрессии, например, по меньшей мере в 1,5 раза, в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза, по меньшей мере в пять раз или по меньшей мере в десять или более раз меньше, чем уровень экспрессии гена в контрольном образце или средний уровень экспрессии генных продуктов в

5 нескольких контрольных образцах.

Термин "ксеногенный" относится к трансплантату, происходящему из животного другого вида.

Как используют в рамках изобретения, термин "молодая Т-клетка" или "более молодая Т-клетка", относится к иммунной эффекторной клетке, которая имеет менее дифференцированный фенотип, например, более молодой клетке, например, молодой Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления более молодая Т-клетка может представлять собой наивную Т-клетку ( $T_N$ ). В некоторых вариантах осуществления молодая Т-клетка может характеризоваться экспрессией CD62L и отсутствием изоформ CD25, CD44 или CD45RO. В некоторых вариантах осуществления более молодая Т-

15 клетка может представлять собой стволовую клетку памяти ( $T_{SCM}$ ). В некоторых вариантах осуществления более молодые Т-клетки могут представлять собой центральную Т-клетку памяти ( $T_{CM}$ ). Фенотипические маркеры, ассоциированные с

$T_N$ ,  $T_{SCM}$  и  $T_{CM}$ , описаны, например, в Maus, M. *et al.* (2014) *Annu. Rev. Immunol.* 32:189-225 (см., например, фиг.3), включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

Иллюстративные фенотипы  $T_N$  включают один или несколько (или все) из следующих:

CD45RA+, CD45RO-, CD62F<sup>high</sup>, CCR7<sup>high</sup>, CD95-, CD122-, CD27<sup>high</sup>, CD28+, CD57-, KFRG-1- или длинную теломеру (или любую комбинацию из двух, трех, четырех, пяти,

25 шести, семи, восьми, девяти или всех из указанных выше маркеров  $T_N$ ). Иллюстративные фенотипы  $T_{SCM}$  включают один или несколько (или все) из следующих: CD45RA+,

CD45RO-, CD62F<sup>high</sup>, CCR7<sup>high</sup>, CD95+, CD122+, CD27<sup>high</sup>, CD28<sup>high</sup>, CD57-, KFRG-1- или длинную теломеру (или любую комбинацию двух, трех, четырех, пяти, шести, семи,

30 фенотипы  $T_{CM}$  включают один или несколько (или все) из следующих: CD45RA-,

CD45RO<sup>high</sup>, CD62F<sup>high</sup>, CCR7+, CD95+, CD122<sup>high</sup>, CD27+, CD28<sup>high</sup>, CD57-, KFRG-1-/+, или длинную/промежуточную теломеру (или любую комбинацию из двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или всех из вышеупомянутых маркеров  $T_{CM}$ ).

35 Как используют в рамках изобретения, термин "более старая Т-клетка" относится к иммунной эффекторной клетке, которая содержит более истощенный фенотип. В некоторых вариантах осуществления более старая Т-клетка может представлять собой эффекторную Т-клетку памяти ( $T_{EM}$ ). В других вариантах осуществления более старая Т-клетка может представлять собой эффекторную Т-клетку ( $T_{EFF}$ ). В других вариантах осуществления более старая Т-клетка имеет фенотип истощения. Фенотипические маркеры, ассоциированные с  $T_{EM}$ ,  $T_{EFF}$  и истощенными Т-клетками, описаны, например,

40 в Maus, M. *et al.* (2014) *Annu. Rev. Immunol.* 32:189-225 (см., например, фиг.3), включенной в настоящее описание в качестве ссылки. Иллюстративные фенотипы  $T_{EM}$  включают

45 один или несколько (или все) из следующих: CD45RA-/+, CD45RO<sup>high</sup>, CD62F-, CCR7-, CD95-, CD122<sup>high</sup>, CD27-/+, CD28-/+, CD57<sup>low</sup>, KFRG-1+ или промежуточную длину теломеры (или любую комбинацию из двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми,

девяти или всех из вышеупомянутых маркеров T<sub>EM</sub>). Иллюстративные фенотипы T<sub>EFF</sub> включают один или несколько (или все) из следующих: CD45RA-/+, CD45RO+, CD62F-, CCR7-, CD95<sup>high</sup>, CD122 -/+, CD27-, CD28-, CD57+, KFRG-1<sup>high</sup>, или короткую/промежуточную теломеру (или любую комбинацию из двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или всех из вышеупомянутых маркеров T<sub>EFF</sub>). Иллюстративные фенотипы фенотипа истощенных Т-клеток включают один или несколько (или все) из следующих: CD45RA-/+, CD45RO+, CD62L-, CCR7-, CD95<sup>high</sup>, CD122<sup>low</sup>, CD27-, CD28-, CD57<sup>high</sup>, KFRG-1<sup>high</sup>, или короткую теломеру (или любую комбинацию из двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или всех из вышеупомянутых маркеров).

Термин "зета" или альтернативно "зета-цепь", "CD3-зета" или "TCR-зета" определяют как белок, представленный под номером доступа GenBank № BAG36664.1, или эквивалентные остатки из не являющегося человеком вида, например, мыши, грызуна, обезьяны, и т.п., и "зета-стимулирующий домен" или альтернативно "стимулирующий домен CD3-зета" или "стимулирующий домен TCR-зета" определяют как аминокислотные остатки из цитоплазматического домена зета-цепи, которые являются достаточными для функциональной передачи первоначального сигнала, необходимого для активации Т-клеток. В одном аспекте цитоплазматический домен зета-цепи содержит остатки с 52 по 164 последовательности с номером доступа GenBank № BAG36664.1 или эквивалентные остатки из не являющегося человеком вида, например, мыши, грызуна, мартышки, человекообразной обезьяны и т.п., которые являются их функциональными ортологами. В одном аспекте "зета-стимулирующий домен" или "стимулирующий домен CD3-зета" представляет собой последовательность, предоставленную в качестве SEQ ID NO: 18. В одном аспекте "зета-стимулирующий домен" или "стимулирующий домен CD3-зета" представляет собой последовательность, предоставленную в качестве SEQ ID NO: 20.

Различные аспекты изобретения более подробно описаны ниже. На протяжении описания приводятся дополнительные определения.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В рамках настоящего изобретения предусматриваются биомаркеры, прогнозирующие ответ на терапию у индивидуумов, имеющих злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и острый лимфобластный лейкоз (ALL)).

В одном аспекте в рамках настоящего изобретения предусматриваются биомаркеры, прогнозирующие ответ на клетку, экспрессирующую CAR, например, клетку, экспрессирующую CAR против CD19 (например, Т-клетку, НК-клетку) (например, клетку, экспрессирующую CAR против CD19, описанную в настоящем описании, например, такую как STL019) у индивидуумов, имеющих CLL и ALL.

Предусматриваются способы диагностики и мониторинга лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) на основе обнаружения определенных биомаркеров в образцах пациентов, которые имеют или предположительно имеют злокачественную опухоль. Кроме того, экспрессию одного или нескольких таких биомаркеров можно использовать для отличия индивидуумов, которые будут благоприятно отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, "полностью отвечающие индивидуумы" или "CR") от индивидуумов, которые не будут отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, "не отвечающие

индивидуумы" или "NR") и от индивидуумов, которые будут иметь частичный ответ на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, "частично отвечающие индивидуумы" или "PR").

**Применение биомаркеров для оценки прогрессирования заболевания и прогнозирования ответа индивидуума на терапию CAR-экспрессирующими клетками**

В одном варианте осуществления в способах по настоящему изобретению можно использовать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более генов, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1 и/или генную сигнатуру клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток) для получения величины прогрессирования заболевания. Величину прогрессирования заболевания можно использовать, например, для оценки эффективности терапии при лечении злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL). В одном варианте осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более генов в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и/или KLRG1 и/или генную сигнатуру клеток, экспрессирующих CAR против CD19, используют для классификации индивидуума как полностью отвечающего, частично отвечающего или не отвечающего индивидуума на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, CTL019). В одном варианте осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более генов, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, и/или KLRG1, и/или генную сигнатуру клеток, экспрессирующих CAR против CD19, используют для прогнозирования способности индивидуума отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, CTL019).

**Индивидуумы**

Для любых способов и наборов, описанных в настоящем описании, индивидуум, которого лечат, или индивидуум, для которого получают величину, представляет собой индивидуума, имеющего злокачественную опухоль на любой стадии лечения, или имеющего риск ее наличия. Иллюстративные злокачественные опухоли включают, но не ограничиваются ими, В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (В-ALL), Т-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (Т-ALL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический миелогенный лейкоз (СМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (СLL), В-клеточный помиелоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмабластную лимфому, новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток и макроглобулинемию Вальденстрема. В одном варианте

осуществления злокачественная опухоль представляет собой гематологическую злокачественную опухоль. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль представляет собой ALL. В другом варианте осуществления злокачественная опухоль представляет собой CLL. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль ассоциирована с экспрессией CD19.

В одном варианте осуществления индивидууму проводят предварительное лечение дополнительной терапией, например, индивидууму, которого идентифицировали как частично отвечающего или не отвечающего индивидуума, а затем предварительно лечили дополнительной терапией. В одном варианте осуществления индивидууму проводят предварительное лечение ингибитором mTOR. В одном варианте осуществления ингибитор mTOR вводят в дозе или по схеме дозирования, описанной в настоящем описании. В одном варианте осуществления низкую усиливающую иммунитет дозу ингибитора mTOR вводят до лечения индивидуума CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками). В одном варианте осуществления введение низкой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR, например, аллостерического ингибитора, например, RAD001, или каталитического ингибитора, начинают до введения CAR-экспрессирующих клеток, описанных в настоящем описании, например, Т-клеток. В одном варианте осуществления CAR-клетки вводят после достаточного периода времени или достаточного дозирования ингибитора mTOR, так что уровень отрицательных по PD1 иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, или соотношение отрицательные по PD1 иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки/положительные по PD1 иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, по меньшей мере временно увеличивается. В одном варианте осуществления клетку, например, Т-клетку, подлежащую модификации способами инженерии для экспрессии CAR, собирают после достаточного периода времени или после достаточного дозирования низкой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR, так чтобы уровень отрицательных по PD1 иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, или соотношение отрицательные по PD1 иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки/положительные по PD1 иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, у индивидуума или собранных от индивидуума, по меньшей мере временно увеличивался.

В одном варианте осуществления индивидууму проводят предварительное лечение ингибитором точки контроля, например, ингибитором точки контроля, описанным в настоящем описании. Примеры ингибиторных молекул, например, молекул точки контроля, включают PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAF9, аденозин и TGFR (например, TGFR-бета). В некоторых вариантах осуществления ингибиторную нуклеиновую кислоту, например, ингибиторную нуклеиновую кислоту, например, дцРНК, например, миРНК или кшРНК; или например, ингибиторный белок или систему, например, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные кластерами (CRISPR), нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TAFEN), или эндонуклеазу с цинковыми пальцами (ZFN), например, как описано в настоящем описании, можно использовать для ингибирования экспрессии молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию в CAR-экспрессирующей клетке. В одном варианте осуществления средство представляет собой кшРНК, например, кшРНК, описанную в настоящем описании. В одном варианте осуществления ингибитор молекулы точки контроля может

представлять собой, например, антитело или фрагмент антитела, которые связываются с молекулой точки контроля. Например, средство может представлять собой антитело или фрагмент антитела, которые связываются с PD1, PD-F1, PD-F2 (например, как описано в настоящем описании) или CTFA4 (например, ипилимумаб (также обозначаемый как MDX-010 и MDX-101, и выпускаемый в продажу Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; тремелимумаб (моноклональное IgG2-антитело, доступное от Pfizer, ранее известное как тицилимумаб, CP- 675,206)). В одном варианте осуществления средство представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые связываются с TIM3, например, как описано в настоящем описании. В одном варианте осуществления средство представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые связываются с LAG3, например, как описано в настоящем описании. В одном варианте осуществления средство представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые связываются с CEACAM, например, как описано в настоящем описании.

В одном варианте осуществления индивидууму проводят дополнительную терапию в комбинации с терапией CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапией клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как STF019). В одном варианте осуществления индивидууму вводят ингибитор mTOR, например, ингибитор mTOR, описанный в настоящем описании, в комбинации с терапией CAR-экспрессирующими клетками. В одном варианте осуществления ингибитор mTOR вводят в дозе и/или по схеме дозирования, описанной в настоящем описании. В одном варианте осуществления индивидууму вводят ингибитор точки контроля, например, ингибитор точки контроля, описанный в настоящем описании, в комбинации с терапией CAR-экспрессирующими клетками. В одном варианте осуществления ингибитор точки контроля вводят в дозе и/или по схеме дозирования, описанной в настоящем описании. В одном варианте осуществления индивидууму вводят ингибитор киназы, например, ингибитор киназы, описанный в настоящем описании. В одном варианте осуществления ингибитор киназы вводят в дозе и/или по схеме дозирования, описанной в настоящем описании.

В одном варианте осуществления индивидуум идентифицирован как не отвечающий индивидуум и индивидууму проводят терапию, отличную от терапии CAR-экспрессирующими клетками, например, стандартную терапию для конкретного типа злокачественной опухоли. В одном варианте осуществления индивидууму вводят одно или несколько из антитела против CD20 или его функционального фрагмента (например, офатумумаб, ритуксимаб, обинутузумаб), антитела против CD52 или его функционального фрагмента (например, алемтузумаб), алкилирующего средства (например, алкилирующее средство на основе азотистого иприта, например, такое как бендамустин HCl, хлорамбуцил, циклофосфамид), ингибитора киназы (например, ингибитор киназы, описанный в настоящем описании, например, такой как ингибитор ВТК, описанный в настоящем описании, или ингибитор фосфонозитид-3-киназы, описанный в настоящем описании). В одном варианте осуществления индивидууму вводят трансплантат стволовых клеток.

### **Оценка биомаркеров**

#### *Анализ биомаркеров CTL019*

Анализ уровней экспрессии и/или активности продуктов генов, коррелирующих с ответом индивидуума на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019) и прогрессированием онкологического заболевания (например, гематологической



злокачественной опухоли, такой как CLL и ALL) привел к идентификации новых генных сигнатур клеток, экспрессирующих CAR против CD19. Например, настоящее изобретение относится к способам оценки уровня экспрессии одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, пятнадцати, двадцати, двадцати пяти, тридцати, тридцати пяти, сорока, сорока пяти, пятидесяти, ста или более генов из таблицы 1А, таблицы 1В, таблицы 7А, таблицы 7В, таблицы 8, таблицы 9, таблицы 10, таблицы 14, таблицы 15, таблицы 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблицы 17, таблицы 18, таблицы 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD 122, CD62L и KLRG1, которые составляют генную сигнатуру клеток, экспрессирующих CAR против CD19.

В таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, приводятся гены (например, белковые биомаркеры) и PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и/или KLRG1 являются генами (например, белковыми биомаркерами), которые иначе экспрессируются у полностью отвечающих индивидуумов по сравнению с частично отвечающими и не отвечающими индивидуумами.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению можно использовать для определения способности индивидуума отвечать на лечение терапией CAR-экспрессирующими клетками (например, клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками), описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019), где статистически значимое отличие в количестве, например, экспрессии и/или активности, маркера, описанного в настоящем описании, относительно эталона, например, срединной величины для популяции пациентов со злокачественной опухолью (например, гематологической злокачественной опухолью, такой как CLL и ALL), срединной величины для популяции здоровых не имеющих злокачественной опухоли индивидуумов, срединной величины для популяции не отвечающих или частично отвечающих индивидуумов, в выборке индивидуумов указывает на более высокую вероятность ответа заболевания на терапию CAR-экспрессирующими клетками.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу или анализу для идентификации индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как CLL и ALL), как имеющего увеличенную или сниженную вероятность ответа на лечение, которое включает терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019), причем способ включает:

- (1) получение образца от индивидуума;
- (2) определение уровня одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или более) маркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1 в образце; и
- (3) сравнение определенного уровня одного или нескольких маркеров с эталонным уровнем; где отличие, например, статистически значимое отличие, в определенном уровне относительно эталонного уровня прогнозирует способность индивидуума отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками; и
- (4) идентификацию индивидуума как полностью отвечающего, частично отвечающего или не отвечающего индивидуума на терапию CAR-экспрессирующими клетками.

В одном варианте осуществления образец представляет собой образец крови, плазмы или сыворотки. В одном варианте осуществления образец представляет собой образец, полученный посредством афереза, например, Т-клетки, полученные из крови индивидуума. В одном варианте осуществления образец представляет собой образец произведенного продукта, например, модифицированные способами генной инженерии Т-клетки, полученные из крови индивидуума, например, произведенный продукт CAR-экспрессирующих клеток, например, произведенный продукт клеток, экспрессирующих CAR против CD19.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу или анализу для идентификации индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, включая, но не ограничиваясь ими, В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (В-ALL), Т-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (Т-ALL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический миелогенный лейкоз (СМL), хронический лимфоцитарный лейкоз (СLЛ), В-клеточный промиелоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмобластную лимфому, новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток и макроглобулинемию Вальденстрема. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль представляет собой гематологическую злокачественную опухоль. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль представляет собой ALL. В другом варианте осуществления злокачественная опухоль представляет собой CLL. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль ассоциирована с экспрессией CD19.

В одном варианте осуществления терапия CAR-экспрессирующими клетками включает терапию CAR-экспрессирующими клетками, описанными в настоящем описании, например, STL019.

В одном варианте осуществления терапия CAR-экспрессирующими клетками состоит из терапии CAR-экспрессирующими клетками, описанными в настоящем описании, например, STL019.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу или анализу для идентификации индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как CLL и ALL) как имеющего увеличенную или сниженную вероятность ответа на лечение, которое включает терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как STL019), причем способ включает:

- (1) получение образца от индивидуума;
- (2) определение генной сигнатуры в образце; и
- (3) сравнение определенной генной сигнатуры с эталонной генной сигнатурой; где отличие, например, статистически значимое отличие, в уровне экспрессии одного или нескольких маркеров в определенной генной сигнатуре, например, по сравнению с заданной величиной, прогнозирует способность индивидуума отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу или анализу для

определения способности индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как CLL и ALL) отвечать на лечение, включающее клетку, экспрессирующую CAR (например, клетка, экспрессирующая CAR против CD19, например, клетка, экспрессирующая CAR против CD19 (например, Т-клетка, НК-клетка), описанная в настоящем описании, например, такая как CTL019), причем способ включает:

определение уровня одного или нескольких маркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1 в образце, полученном до

лечения;

где статистически значимое отличие в уровне экспрессии одного или нескольких маркеров в образце относительно заданной величины указывает на увеличенную способность отвечать на CAR-экспрессирующую клетку.

Способы, описанные в настоящем описании, являются особенно пригодными для идентификации индивидуумов, которые вероятно будут отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019) до начала такого лечения (например, до терапии) или на раннем этапе терапевтического режима. В некоторых вариантах осуществления экспрессию или активность биомаркеров определяют у индивидуума по меньшей мере за 2 недели, по меньшей мере за 1 месяц, по меньшей мере за 3 месяца, по меньшей мере за 6 месяцев или по меньшей мере за 1 год до начала терапии. В некоторых вариантах осуществления экспрессию или активность биомаркеров количественно определяют менее чем за 6 месяцев до начала терапии. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления экспрессию или активность биомаркеров измеряют в пределах 6 месяцев, 5 месяцев, 4 месяцев, 3 месяцев, 2 месяцев, 1 месяца, 2 недель, 1 недели, 6 суток, 5 суток, 4 суток, 3 суток, 2 суток или 1 суток до начала терапии. В других вариантах осуществления экспрессию или активность биомаркеров определяют после начала терапии (например, через 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 3,5 месяца, 4 месяца, 4,5 месяца, 5 месяцев, 5,5 месяца, 6 месяцев).

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу оценки индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как CLL и ALL), включающему:

получение величины статуса ответа для индивидуума, которая включает один или несколько из следующих показателей:

один или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более) биомаркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, биомаркер CD27, биомаркер CD45RO, биомаркер PD-1, биомаркер LAG-3, биомаркер TIM-3, биомаркер IL2RA, биомаркер IL21, биомаркер CD4, биомаркер CD8, сигнатура набора генов TH1+ Т-хелперных клеток, сигнатура набора генов TH2+ Т-хелперных клеток, сигнатура набора генов Т-клеток памяти (например, CD8+ Т-клеток памяти, например, наивных Т-клеток (T<sub>N</sub>), например стволовых клеток памяти (T<sub>SCM</sub>), например, центральных Т-клеток памяти (T<sub>CM</sub>), например, эффекторных Т-клеток памяти (T<sub>EM</sub>)) и сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, тем самым оценивая индивидуума.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу оценки индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как CLL и ALL), включающему получение величины статуса ответа для индивидуума, которая включает один или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более) из следующих показателей: биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1, и сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, тем самым оценивая индивидуума.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу оценки или мониторинга эффективности терапии CAR-экспрессирующими клетками у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, включающему:

получение величины статуса ответа для индивидуума, которая включает один или несколько из следующих показателей:

биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, биомаркер CD27, биомаркер CD45RO, биомаркер PD-1, биомаркер LAG-3, биомаркер TIM-3, биомаркер IL2RA, биомаркер IL21, биомаркер CD4, биомаркер CD8, сигнатура набора генов TH1+ Т-хелперных клеток, сигнатура набора генов TH2+ Т-хелперных клеток, сигнатура набора генов Т-клеток памяти (например, CD8+ Т-клеток памяти, например, наивных Т-клеток (T<sub>N</sub>), например стволовых клеток памяти (T<sub>SCM</sub>), например, центральных Т-клеток памяти (T<sub>CM</sub>), например, эффекторных Т-клеток памяти (T<sub>EM</sub>)) и сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19,

тем самым оценивая или осуществляя мониторинг эффективность терапии CAR у индивидуума.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу оценки или мониторинга эффективности терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019) у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как CLL и ALL), включающему: получение величины статуса ответа у индивидуума, которая включает один или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более) из следующих показателей: биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1 и сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток), тем самым, осуществляя оценку или мониторинг эффективности терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) у индивидуума.

В одном варианте осуществления величина статуса ответа включает показатель комбинации генной сигнатуры и биомаркера.

В одном варианте осуществления величина статуса ответа включает показатель сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, и комбинацию одного или нескольких из: биомаркера, приведенного в таблице 1А, таблице 1В, таблице

7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, биомаркера CD27, биомаркера CD45RO, биомаркера PD-1, биомаркера LAG-3, биомаркера TIM-3, биомаркера IL2RA, биомаркера IL21, биомаркера CD4, биомаркера CD8, сигнатуры набора генов TH1+ Т-хелперных клеток, сигнатуры набора генов TH2+ Т-хелперных клеток и сигнатуры набора генов Т-клеток памяти (например, CD8+ Т-клеток памяти, например, наивных Т-клеток ( $T_N$ ), например стволовых клеток памяти ( $T_{SCM}$ ), например, центральных Т-клеток памяти ( $T_{CM}$ ), например, эффекторных Т-клеток памяти ( $T_{EM}$ )).

В одном варианте осуществления величина статуса ответа включает показатель сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, и комбинацию одного или нескольких из: биомаркера, приведенного в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1.

В одном варианте осуществления величина статуса ответа включает показатель одного или нескольких биомаркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, и комбинацию одного или нескольких из: биомаркера CD27, биомаркера CD45RO, биомаркера PD-1, биомаркера LAG-3, биомаркера TIM-3, биомаркера IL2RA, биомаркера IL21, биомаркера CD4, биомаркера CD8, сигнатуры набора генов TH1+ Т-хелперных клеток, сигнатуры набора генов TH2+ Т-хелперных клеток, сигнатуры набора генов Т-клеток памяти (например, CD8+ Т-клеток памяти, например, наивных Т-клеток ( $T_N$ ), например стволовых клеток памяти ( $T_{SCM}$ ), например, центральных Т-клеток памяти ( $T_{CM}$ ), например, эффекторных Т-клеток памяти ( $T_{EM}$ )) и сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19.

В одном варианте осуществления величина статуса ответа включает показатель одного или нескольких биомаркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, и комбинацию одного или нескольких из: CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1.

В одном варианте осуществления сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, включает величину экспрессии по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9 или 10 генов, включающую генную сигнатуру клеток, экспрессирующих CAR против CD19.

В одном варианте осуществления величина экспрессии гена включает величину параметра транскрипции, например, уровень мРНК, кодируемой геном.

В одном варианте осуществления величина экспрессии белка включает величину параметра трансляции, например, уровень белка.

В одном варианте осуществления предусматриваемые способы, кроме того, включают получение образца от индивидуума, где образец включает фракцию клеток или тканей. В одном варианте осуществления клеточная фракция включает кровь.

В одном варианте осуществления показатель биомаркера и/или генной сигнатуры получают до, одновременно или в процессе терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019).

В одном варианте осуществления показатель биомаркера и/или генной сигнатуры получают менее чем за 6 месяцев, 5 месяцев, 4 месяца, 3 месяца, 2 месяца, 1 месяц, 2 недели, 1 неделю, 6 суток, 5 суток, 4 суток, 3 суток, 2 суток до начала терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019).

Способы, описанные в настоящем описании, также можно использовать для мониторинга положительного ответа индивидуума на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019). Такие способы являются пригодными для раннего обнаружения толерантности к терапии или для прогнозирования прогрессирования заболевания у индивидуума. В таких вариантах осуществления экспрессию или активность биомаркера определяют, например, по меньшей мере каждую неделю, по меньшей мере каждые 2 недели, по меньшей мере каждый месяц, по меньшей мере каждые 2 месяца, по меньшей мере каждые 3 месяца, по меньшей мере каждые 4 месяца, по меньшей мере каждые 5 месяцев, по меньшей мере каждые 6 месяцев, по меньшей мере каждые 7 месяцев, по меньшей мере каждые 8 месяцев, по меньшей мере каждые 9 месяцев, по меньшей мере каждые 10 месяцев, по меньшей мере каждые 11 месяцев, по меньшей мере каждый год, по меньшей мере каждые 18 месяцев, по меньшей мере каждые 2 года, по меньшей мере каждые 3 года, по меньшей мере каждые 5 лет или более. Также предусматривается, что экспрессию или активность биомаркеров определяют с нерегулярными интервалами, например, определение биомаркеров у индивидуума можно проводить после 3 месяцев лечения, после 6 месяцев лечения и после 7 месяцев лечения. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления экспрессию или активность биомаркеров определяют тогда, когда это сочтут необходимым квалифицированный врач, осуществляющий мониторинг лечения индивидуума.

Способы, описанные в настоящем описании, можно использовать для лечения любого индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как CLL и ALL). В одном аспекте изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как CLL и ALL) у индивидуума.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли, включающей, но не ограничивающейся ими, В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (В-ALL), Т-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (Т- ALL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический миелогенный лейкоз (СМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (СLL), В-клеточный промиелоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфомуМАЛТ, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмобластную лимфому, новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток и макроглобулинемию Вальденстрема. В одном варианте осуществления изобретение относится к способам лечения ALL. В другом варианте осуществления изобретение относится к способам лечения CLL. В одном варианте осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли, ассоциированной с экспрессией CD19.

В одном варианте осуществления предусматриваемые способы включают введение индивидууму клетки, экспрессирующей CAR, например, CAR Т-клетки, например, CAR Т-клетки против CD19, например, продукта CTL019, если у индивидуума идентифицировано отличие, например, статистически значимое отличие, уровня экспрессии одного или нескольких маркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В,

таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1 относительно эталонного уровня, так что осуществляется лечение злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) у индивидуума.

Как описано выше, злокачественная опухоль, которую можно лечить описанными способами, представляет собой злокачественную опухоль, ассоциированную с экспрессией CD19. В одном аспекте злокачественная опухоль, ассоциированная с экспрессией CD19, представляет собой гематологическую злокачественную опухоль. В одном аспекте гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лейкоз или лимфому. В одном аспекте злокачественная опухоль, ассоциированная с экспрессией CD19, включает злокачественные опухоли и новообразования, включающие, но не ограничивающиеся ими, например, один или несколько острых лейкозов, включая, но не ограничиваясь ими, например, В-клеточный острый лимфоидный лейкоз ("В-ALL"), Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз ("Т-ALL"), острый лимфоидный лейкоз (ALL); один или несколько хронических лейкозов, включая, но не ограничиваясь ими, например, хронический миелогенный лейкоз (СМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (СLЛ). Дополнительные злокачественные опухоли или гематологические состояния, ассоциированные с экспрессией CD19, включают, но не ограничиваются ими, например, В-клеточный промиелоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмабластную лимфому, новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема, и "предлейкоз", который представляет собой многообразную совокупность гематологических состояний, объединенных неэффективной продукцией (или дисплазией) миелоидных клеток крови и т.п. Кроме того, заболевание, ассоциированное с экспрессией CD19, включает, но не ограничивается ими, например, атипичные и/или неклассические злокачественные опухоли, новообразования, предзлокачественные состояния и пролиферативные заболевания, ассоциированные с экспрессией CD19.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как ALL и CLL), включающему:

определение того, имеет ли индивидуум увеличенную вероятность ответа на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019) путем сравнения уровня одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более) маркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1, в образце от индивидуума относительно эталонного уровня, где статистически значимое отличие в уровне экспрессии одного или нескольких маркерных генов относительно эталонного уровня указывает на увеличенную вероятность ответа; и

введение индивидууму терапевтически эффективной дозы терапии CAR-экспрессирующими клетками.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как ALL и CLL), включающему:

получение образца от индивидуума;

определение уровня одного или нескольких маркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1 в образце;

сравнение определенного уровня одного или нескольких маркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1, с эталонным уровнем; и

ведение терапевтически эффективной дозы терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019), если индивидуум идентифицирован как имеющий статистически значимое отличие определенного уровня одного или нескольких маркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1, от эталонного уровня, в образце.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) у индивидуума, включающему:

получение величины статуса ответа для индивидуума, которая включает один или несколько из следующих показателей:

биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, биомаркер CD27, биомаркер CD45RO, биомаркер PD-1, биомаркер LAG-3, биомаркер TIM-3, биомаркер IL2RA, биомаркер IL21, биомаркер CD4, биомаркер CD8, сигнатура набора генов TH1+ Т-хелперных клеток, сигнатура набора генов TH2+ Т-хелперных клеток, сигнатура набора генов Т-клеток памяти (например, CD8+ Т-клеток памяти, например, наивных Т-клеток ( $T_N$ ), например стволовых клеток памяти ( $T_{SCM}$ ), например, центральных Т-клеток памяти ( $T_{CM}$ ), например, эффекторных Т-клеток памяти ( $T_{EM}$ )) и сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, и

после определения статуса ответа проведение одного, двух, трех, четырех или более из:

идентификации индивидуума как полностью отвечающего, частично отвечающего или не отвечающего;

проведения терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019);

выбора или изменения дозирования терапии CAR-экспрессирующими клетками;



выбора или изменения схемы и длительности терапии CAR-экспрессирующими клетками;

введения, например, не отвечающему или частично отвечающему индивидууму, дополнительного средства в комбинации с терапией CAR-экспрессирующими клетками, например, ингибитора точки контроля, например, ингибитора точки контроля, описанного в настоящем описании;

проведения у не отвечающего индивидуума или частично отвечающего индивидуума терапии, которая увеличивает количество наивных Т-клеток у индивидуума, перед лечением терапией CAR-экспрессирующими клетками;

модификации процесса производства для терапии CAR-экспрессирующими клетками, например, увеличение в количестве наивных Т-клеток перед введением нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, например, для индивидуума, идентифицированного как не отвечающий или частично отвечающий индивидуум; или

выбора альтернативной терапии, например, для не отвечающего индивидуума или частично отвечающего индивидуума; или

выбора альтернативной терапии, например, альтернативной терапии, описанной в настоящем описании, например, стандартной терапии злокачественной опухоли, тем самым, осуществляя лечение злокачественной опухоли у индивидуума.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения

злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) у индивидуума, включающему: получение величины статуса

ответа для индивидуума, которая включает один или несколько из следующих показателей: биомаркер, приведенный в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например,

CCL20, IL-17a и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1, и сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, и после определения статуса ответа, проведение одного, двух, трех,

четырёх или более из: идентификации индивидуума как полностью отвечающего индивидуума, частично отвечающего индивидуума или не отвечающего индивидуума;

проведения терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019); выбора или изменения дозирования терапии CAR-

экспрессирующими клетками; выбора или изменения схемы и длительности терапии CAR-экспрессирующими клетками; введения, например, не отвечающему или частично

отвечающему индивидууму, дополнительного средства в комбинации с терапией CAR-экспрессирующими клетками, например, ингибитора точки контроля, например, ингибитора точки контроля, описанного в настоящем описании; проведения у не

отвечающего индивидуума или частично отвечающего индивидуума терапии, которая увеличивает количество наивных Т-клеток у индивидуума, перед лечением терапией

CAR-экспрессирующими клетками; модификации процесса производства для терапии CAR-экспрессирующими клетками, например, увеличение в количестве наивных Т-клеток перед введением нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в Т-клетки, например,

для индивидуума, идентифицированного как не отвечающий или частично отвечающий индивидуум; выбора альтернативной терапии, например, стандартной терапии

злокачественной опухоли, например, для не отвечающего или частично отвечающего индивидуума; или выбора альтернативной терапии CAR-экспрессирующими клетками; тем самым, осуществляя лечение злокачественной опухоли у индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления количество биомаркера, определенное в

образце индивидуума, количественно определяют в качестве абсолютной величины (например, нг/мл). Абсолютные величины можно без труда сравнивать с эталонной величиной или пороговой величиной. Например, можно определять пороговую величину, которая отражает статус прогрессирования заболевания; любые абсолютные величины, находящиеся либо выше (т.е. биомаркеры, экспрессия которых увеличивается при прогрессировании злокачественной опухоли, например, гематологических злокачественных опухолей, таких как ALL и CLL), либо ниже (т.е. биомаркеры со сниженной экспрессией при прогрессировании злокачественной опухоли, например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) пороговой величины, вероятно, определяют прогрессирование заболевания.

Альтернативно определяют относительное количество биомаркера. В одном варианте осуществления относительное количество определяют путем сравнения экспрессии и/или активности одного или нескольких биомаркеров у индивидуума со злокачественной опухолью с эталонным параметром экспрессии биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления эталонный параметр получают из одного или нескольких из: исходного уровня или предшествующей величины для индивидуума, величины для индивидуума в другой момент времени, средней или срединной величины для популяции индивидуумов со злокачественной опухолью (например, пациентов), здорового контроля или популяции здоровых индивидуумов.

Настоящее изобретение также относится к области предсказательной медицины, в которой диагностические анализы, фармакогеномику и клинические испытания по мониторингу используют для целей прогнозирования, чтобы тем самым лечить индивидуума профилактически. Таким образом, один аспект настоящего изобретения относится к способам анализа для определения количества, структуры и/или активности полипептидов или нуклеиновых кислот, соответствующих одному или нескольким биомаркерам, описанным в настоящем описании, для определения того, будет ли индивидуум, имеющий злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как CLL и ALL) или имеющий риск развития злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как CLL и ALL) с большей вероятностью отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019).

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к способу определения того, вероятно ли, что индивидуум со злокачественной опухолью (например, гематологической злокачественной опухолью, такой как CLL и ALL) будет отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками, например, клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, такими как CTL019. В другом аспекте изобретение относится к способу прогнозирования продолжительности заболевания. В другом аспекте, способ относится к прогнозированию вероятности значительного явления в процессе заболевания (например, повторного возникновения или ремиссии). В определенных вариантах осуществления способ включает обнаружение комбинации биомаркеров, ассоциированных со способностью отвечать на лечение, как описано в настоящем описании, и определение вероятности того, что индивидуум будет отвечать на лечение.

В одном аспекте изобретение относится к способу предоставления прогноза вероятности успеха терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанной в настоящем описании, например, такими как CTL019) у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль

(например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как ALL и CLL), причем указанный способ включает стадии:

предоставления биологического образца от индивидуума;

5 определения уровней экспрессии одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более) генов, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1, с получением профиля экспрессии генов для образца; и  
10 на основе полученного профиля экспрессии генов предоставление прогноза индивидууму.

В одном варианте осуществления стадия определения уровней экспрессии набора генов, кроме того, включает обнаружение экспрессии мРНК, экспрессируемой с  
указанных генов. В одном варианте осуществления предусматриваемые способы, кроме  
15 того, включают стадию, где определение экспрессии мРНК включает воздействие на указанную мРНК зонда нуклеиновой кислоты, комплементарного указанной мРНК.

В одном варианте осуществления стадия определения уровней экспрессии набора генов, кроме того, включает обнаружение экспрессии полипептида, кодируемого  
указанными генами.

В одном варианте осуществления предусматриваемые способы включают выбор  
20 терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, описанными в настоящем описании, например, такими как CTL019) для индивидуума на основе предоставленного прогноза.

В некоторых вариантах осуществления способы вовлекают оценку биологического  
25 образца, например, образца от индивидуума, например, пациента, у которого диагностировано или предполагается наличие злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как CLL или ALL, например, присутствуют симптомы CLL или ALL) для обнаружения изменений экспрессии и/или  
30 активности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или более генов, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1 и генной сигнатуры клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток).

Результаты способа скрининга и их интерпретация прогнозируют прогрессирование  
35 заболевания у пациента (например, прогрессирование злокачественной опухоли, например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL или CLL). В соответствии с настоящим изобретением, изменения экспрессии или активности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или более генов, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16  
40 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1 и генной сигнатуры клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток) относительно средней или срединной величины для популяции пациентов со злокачественной опухолью или относительно срединной величины для популяции здоровых не имеющих  
45 злокачественной опухоли индивидуумов указывают на прогрессирование злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL).

В другом варианте осуществления одно или несколько изменений, например,

изменений экспрессии биомаркеров, оценивают с заданными интервалами, например, в первый момент времени и по меньшей мере в последующий момент времени. В одном варианте осуществления продолжительность определяют путем определения времени между значимыми явлениями в ходе заболевания индивидуума, где измерение прогнозирует, будет ли заболевание индивидуума иметь длительное течение. В другом варианте осуществления значительное явление представляет собой прогрессирование от постановки диагноза до смерти. В другом варианте осуществления значительное явление представляет собой прогрессирование от постановки диагноза до ухудшения заболевания.

#### 10 Способы обнаружения экспрессии генов

Также можно оценивать уровень экспрессии биомаркера. Экспрессию маркера, описанного в настоящем описании, можно оценивать с помощью любого из широкого множества известных способов обнаружения экспрессии транскрибируемой молекулы или белка. Неограничивающие примеры таких способов включают иммунологические

15 способы обнаружения секретируемых, находящихся на клеточной поверхности, цитоплазматических или ядерных белков, способы очистки белков, способы анализа функции или активности белков, способы гибридизации нуклеиновых кислот, способы обратной транскрипции нуклеиновых кислот и способы амплификации нуклеиновых кислот.

В определенных вариантах осуществления активность конкретного гена охарактеризовывают путем количественного определения транскрипта гена (например, мРНК), путем измерения количества транслируемого белка или путем измерения активности продукта гена. Мониторинг экспрессии маркера можно осуществлять различными способами, в том числе, путем обнаружения уровней мРНК, уровней белка

25 или активности белка, любой из которых можно определять с использованием стандартных способов. Обнаружение может вовлекать количественное определение уровня экспрессии гена (например, геномной ДНК, кДНК, мРНК, белка или активности фермента), или альтернативно оно может представлять собой качественную оценку уровня экспрессии гена, в частности, по сравнению с контрольным уровнем. Тип определяемого уровня будет очевиден из контекста.

Способы обнаружения и/или количественного определения транскрипта гена (мРНК или кДНК, полученной на ее основе) с использованием способов гибридизации нуклеиновых кислот известны специалистам в данной области (см., например, Sambrook

35 *et al.*, выше). Например, один способ оценки присутствия, отсутствия или количества кДНК вовлекает саузерн-перенос, как описано выше. В кратком изложении мРНК выделяют (например, с использованием способа экстракции с использованием кислотного гуанидиния-фенола-хлороформа, Sambrook *et al.* выше) и подвергают обратной транскрипции для получения кДНК. Затем кДНК необязательно расщепляют и разделяют на геле в буфере и переносят на мембраны. Затем проводят гибридизацию

40 с использованием зондов нуклеиновой кислоты, специфичных к кДНК-мишени.

Общий принцип таких диагностических и прогностических способов анализа вовлекает подготовку образца или реакционной смеси, которые могут содержать маркер и зонд, в соответствующих условиях в течение времени, достаточного для того, чтобы позволить маркеру и зонду взаимодействовать и связываться, таким образом, формируя

45 комплекс, который может быть извлечен из реакционной смеси и/или обнаружен. Эти способы анализа можно проводить различными способами.

Например, один способ проведения такого анализа вовлекает заякоривание маркера или зонда на твердофазной подложке, также называемой субстратом, и обнаружение

комплексов маркер-мишень/зонд, заякоренных на твердой подложке, в конце реакции. В одном варианте осуществления такого способа образец от индивидуума, который подлежит анализу в отношении присутствия и/или концентрации маркера, можно заякоривать на носителе или твердой подложке. В другом варианте осуществления является возможной обратная ситуация, когда зонд можно заякоривать на твердой фазе и образцу от индивидуума можно позволять реагировать в качестве не заякоренного компонента анализа.

Для проведения анализа с использованием вышеупомянутых подходов не иммобилизованный компонент добавляют к твердой подложке, на которой заякорен второй компонент. После завершения реакции компоненты, не находящиеся в комплексе, можно удалять (например, путем промывания) в условиях, при которых любые образовавшиеся комплексы остаются иммобилизованными на твердой подложке. Обнаружение комплексов маркер/зонд, заякоренных на твердой подложке, можно проводить рядом способов, описанных в настоящем описании.

В другом варианте осуществления зонд, когда он представляет собой не заякоренный компонент анализа, можно метить для обнаружения и считывания данных анализа, либо прямо, либо непрямо, поддающимися обнаружению метками, описанными в настоящем описании и хорошо известными специалисту в данной области.

Также является возможным прямое обнаружение образования комплекса маркер/зонд без дальнейшего манипулирования или мечения любого из компонентов (маркер или зонд), например, с использованием способа переноса энергии флуоресценции (см., например, Lakowicz *et al.*, патент США № 5631169; Stavrianopoulos, *et al.*, патент США № 4868103). Метку-флуорофор на первой, "донорной", молекуле выбирают таким образом, чтобы при возбуждении падающим светом подходящей длины волны испускаемая ей энергия флуоресценции поглощалась флуоресцентной меткой на второй, "акцепторной", молекуле, которая в свою очередь способна к флуоресценции вследствие поглощенной энергии. Альтернативно, в молекуле "донорного" белка можно просто использовать природную энергию флуоресценции остатков триптофана. Выбирают метки, которые испускают свет различной длины волны, так чтобы "акцепторную" молекулу можно было отличить от "донорной". Поскольку эффективность переноса энергии между метками связана с расстоянием, разделяющим молекулы, можно оценивать пространственные взаимоотношения между молекулами. В ситуации, когда между молекулами происходит связывание, испускание флуоресценции метки "акцепторной" молекулы должно быть максимальным. Событие связывания FET можно удобным способом измерять посредством стандартных способов флуориметрического обнаружения, хорошо известных в данной области (например, с использованием флуориметра).

В другом варианте осуществления определение способности зонда распознавать маркер можно проводить без мечения какого-либо компонента анализа (зонд или маркер) с использованием технологии, такой как анализ биомолекулярного взаимодействия в реальном времени (BIA) (см., например, Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, *Anal. Chem.* 63:2338-2345 и Szabo *et al.*, 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). Как используют в рамках изобретения, "BIA" или "поверхностный плазмонный резонанс" представляет собой технологию для исследования биоспецифических взаимодействий в реальном времени без мечения каких-либо участников взаимодействия (например, BIAcore). Изменения массы на связывающей поверхности (указывающее на событие связывания) приводят к изменениям индекса рефракции света вблизи поверхности (оптическое явление поверхностного плазмонного резонанса (SPR)), что приводит к

поддающемуся обнаружению сигналу, который можно использовать в качестве показателя взаимодействий между биологическими молекулами в реальном времени.

Альтернативно в другом варианте осуществления аналогичные диагностические и прогностические способы анализа можно проводить с использованием маркера и зонда в качестве растворенных соединений в жидкой фазе. В таком анализе комплекс маркера и зонда отделяют от не образовавших комплекс компонентов любым из ряда стандартных способов, включая, но не ограничиваясь ими: дифференциальное центрифугирование, хроматографию, электрофорез и иммунопреципитацию. При дифференциальном центрифугировании комплексы маркер/зонд можно отделять от не образовавших комплекс компонентов анализа посредством серии стадий центрифугирования вследствие различающегося равновесия седиментации комплексов, исходя из их различных размеров и плотностей (см., например, Rivas, G., и Minton, A.P., 1993, *Trends Biochem Sci.* 18(8):284-7). Также для отделения молекул в комплексе от молекул, не образовавших комплекс, можно использовать стандартные способы хроматографии. Например, гель-фильтрация разделяет молекулы на основе размера, и с использованием соответствующей смолы для гель-фильтрации в формате колонки, например, относительно более крупный комплекс может быть отделен от относительно меньших не образовавших комплекс компонентов. Аналогично, относительно различающиеся зарядовые свойства комплекса маркер/зонд по сравнению с не образовавшими комплекс компонентами можно использовать для отличия комплекса от не образовавших комплекс компонентов, например, с использованием смол ионообменной хроматографии. Такие смолы и способы хроматографии хорошо известны специалисту в данной области (см., например, Heegaard, N.H., 1998, *J. Mol. Recognit.* Winter 11(1-6):141-8; Hage, D.S., и Tweed, S.A. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997 Oct 10; 699(1-2):499-525). Также для отделения образовавших комплекс компонентов анализа от не связанных компонентов можно использовать гель-электрофорез (см., например, Ausubel *et al*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1987-1999). В этом способе комплексы белков или нуклеиновых кислот разделяют на основе, например, размера или заряда. Для поддержания связывающего взаимодействия в процессе электрофореза обычно используют неденатурирующие материалы матрикса геля и условия в отсутствие восстановителя. Соответствующие условия конкретного анализа и его компоненты хорошо известны специалисту в данной области.

В конкретном варианте осуществления уровень мРНК, соответствующей маркеру, можно определять в формате как *in situ*, и так и *in vitro*, в биологическом образце с использованием способов, известных в данной области. Термин "биологический образец" включает ткани, клетки, биологические жидкости и их изоляты, полученные от индивидуума, а также ткани, клетки и жидкости, находящиеся в индивидууме. Во многих способах обнаружения экспрессии используют выделенную РНК. Для способов *in vitro* любой способ выделения РНК, который не осуществляет селекцию, направленную против выделения мРНК, можно использовать для очистки РНК из клеток (см., например, Ausubel *et al*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York 1987-1999). Кроме того, большое количество образцов тканей можно без труда обрабатывать с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области, например, таких как одностадийный способ выделения РНК Chomczynski (1989, патент США № 4843155).

Выделенную нуклеиновую кислоту можно использовать в способах с использованием гибридизации или амплификации, которые включают, но не ограничиваются ими, способы саузерн-анализа или нозерн-анализа, анализа с использованием полимеразной

цепной реакции или матрицы с зондами. Один из диагностических способов определения уровней мРНК вовлекает приведение в контакт выделенной мРНК с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК, кодируемой подвергаемым обнаружению геном. Зонд на основе нуклеиновой кислоты может представлять собой, например, полноразмерную кДНК или ее часть, такую как олигонуклеотид длиной по меньшей мере 7, 15, 30, 50, 100, 250 или 500 нуклеотидов, и достаточную для специфической гибридизации в жестких условиях с мРНК или геномной ДНК, кодирующей маркер по настоящему изобретению. Другие подходящие зонды для применения в диагностических способах анализа описаны в настоящем описании. Гибридизация мРНК с зондом указывает на то, что рассматриваемый маркер экспрессируется.

В одном формате мРНК иммобилизуют на твердой подложке и приводят в контакт с зондом, например, путем разделения выделенной мРНК на агарозном геле и переноса мРНК с геля на мембрану, такую как нитроцеллюлозная мембрана. В альтернативном формате зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности и мРНК приводят в контакт с зондом(ами), например, на геномном чипе Affymetrix. Квалифицированный специалист без труда адаптирует известные способы обнаружения мРНК для применения для определения уровня мРНК, кодируемой маркерами, описанными в настоящем описании.

Зонды могут быть полноразмерными или могут быть меньшими, чем полноразмерная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок. Более короткие зонды эмпирически исследуют в отношении специфичности. Иллюстративные зонды нуклеиновой кислоты имеют длину 20 оснований или более (см., например, Sambrook *et al.* для способов селекции последовательностей зондов нуклеиновой кислоты для применения в гибридизации нуклеиновых кислот). Визуализация гибридизованных участков позволяет качественное определение присутствия или отсутствия кДНК.

Альтернативный способ определения уровня транскрипта, соответствующего маркеру по настоящему изобретению, в образце вовлекает процесс амплификации нуклеиновых кислот, например, посредством ОТ-ПЦР (экспериментальный вариант осуществления, указанный в Mullis, 1987, патент США № 4683202), лигазной цепной реакции (Barany, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:189-193), самоограниченной репликации последовательностей (Guatelli *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), транскрипционной системы амплификации (Kwoh *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), способа с Q-бета репликазой (Lizardi *et al.*, 1988, *Bio/Technology* 6:1197), репликации по принципу катящегося кольца (Lizardi *et al.*, патент США № 5854033) или любого другого способа амплификации нуклеиновых кислот с последующим обнаружением амплифицированных молекул с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области. В способах по изобретению также можно использовать флуорогенную ОТ-ПЦР. Во флуорогенной ОТ-ПЦР количественное определение основано на величине флуоресцентных сигналов, например, TaqMan и *sybr green*. Эти схемы обнаружения являются особенно пригодными для обнаружения молекул нуклеиновых кислот, если такие молекулы присутствуют в очень низких количествах. Как используют в рамках изобретения, праймеры для амплификации определяют как пару молекул нуклеиновых кислот, которые могут гибридизоваться с 5'- или 3'-областями гена (плюс- и минус-цепи, соответственно, или наоборот) и содержат короткую область между ними. Как правило, праймеры для амплификации имеют длину приблизительно от 10 до 30 нуклеотидов и фланкируют область длиной приблизительно от 50 до 200 нуклеотидов. В соответствующих условиях и с использованием соответствующих реагентов такие праймеры позволяют амплификацию молекулы

нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, фланкированную праймерами.

Для способов *in situ* нет необходимости в выделении мРНК перед обнаружением. В таких способах образец клеток или ткани получают/обрабатывают с использованием известных гистологических способов. Затем образец иммобилизуют на подложке, как правило, предметном стекле, а затем приводят в контакт с зондом, с которым может гибридизоваться с мРНК, которая кодирует маркер.

В качестве альтернативы определению на основе абсолютного уровня экспрессии маркера определение может быть основано на нормализованном уровне экспрессии маркера. Уровень экспрессии нормализуют путем внесения поправки в абсолютный уровень экспрессии посредством его сравнения с экспрессией гена, который не является маркером, например, гена домашнего хозяйства, который конститутивно экспрессируется. Подходящие гены для нормализации включают гены домашнего хозяйства, такие как ген актина или специфические гены эпителиальных клеток. Эта нормализация позволяет сравнение уровня экспрессии в одном образце, например, образце от индивидуума, с уровнем экспрессии в другом образце, например, от здорового индивидуума, или между образцами из различных источников.

Альтернативно уровень экспрессии может быть предоставлен в качестве относительного уровня экспрессии. Для определения относительного уровня экспрессии маркера уровень экспрессии маркера можно определять для 10 или более образцов нормальных изолятов против изолятов злокачественной опухоли, или даже для 50 или более образцов, перед определением уровня экспрессии в рассматриваемом образце. Можно определять средний уровень экспрессии каждого из генов, анализируемых в большом количестве образцов, и его можно использовать в качестве исходного уровня экспрессии для маркера. Затем уровень экспрессии маркера, определенный для исследуемого образца (абсолютный уровень экспрессии) можно делить на среднюю величину экспрессии, полученную для этого маркера. Это обеспечивает относительный уровень экспрессии.

В определенных вариантах осуществления образцы, используемые для определения исходного уровня, представляют собой образцы, происходящие от индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как ALL и CLL) против образцов того же типа ткани от здорового индивидуума. Выбор источника клеток зависит от использования относительного уровня экспрессии. Использование экспрессии, обнаруживаемой в нормальных тканях, в качестве среднего показателя экспрессии, способствует подтверждению того, что анализируемый маркер является специфическим для ткани, из которой происходит клетка (против нормальных клеток). Кроме того, по мере накопления данных, среднюю величину экспрессии можно пересматривать, предоставляя улучшенные величины относительной экспрессии на основе накопленных данных. Данные об экспрессии в нормальных клетках обеспечивают средние значения для определения тяжести онкологического заболевания.

В другом варианте осуществления экспрессию маркера оценивают путем получения геномной ДНК или мРНК/кДНК (т.е., транскрибированного полинуклеотида) из клеток в образце индивидуума и гибридизации геномной ДНК или мРНК/кДНК с эталонным полинуклеотидом, который комплементарен полинуклеотиду, содержащему маркер, и его фрагментами. Необязательно перед гибридизацией с эталонным полинуклеотидом кДНК можно амплифицировать с использованием любого из множества способов полимеразной цепной реакции. Аналогично, экспрессию одного или нескольких



маркеров можно обнаруживать с использованием количественной ПЦР (Q-ПЦР) для оценки уровня экспрессии маркера(ов). Альтернативно любой из известных способов обнаружения мутаций или вариантов (например, однонуклеотидные полиморфизмы, делеции и т.д.) маркера по изобретению можно использовать для обнаружения встречаемости мутантного маркера у индивидуума.

В родственном варианте осуществления смесь транскрибированных полинуклеотидов, полученных из образца, приводят в контакт с подложкой, на которой фиксирован полинуклеотид, комплементарный или гомологичный по меньшей мере части (например, по меньшей мере 7, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 500 или более нуклеотидным остаткам) маркера, описанного в настоящем описании. Если полинуклеотиды, комплементарные или гомологичные маркеру, описанному в настоящем описании, по-разному обнаруживаются на подложке (например, обнаруживаются с использованием различных хромофоров или флуорофоров, или фиксированы к различным выбранным положениям), тогда уровни экспрессии множества маркеров можно оценивать одновременно с использованием одной подложки (например, микроматрицы "генный чип" с полинуклеотидами, фиксированными в определенных положениях). Когда используют способ оценки экспрессии маркеров, который вовлекает гибридизацию одной нуклеиновой кислоты с другой, гибридизацию можно проводить в жестких условиях гибридизации.

В другом варианте осуществления используют комбинацию способов для оценки экспрессии маркера.

Поскольку композиции, наборы и способы основаны на обнаружении отличий в уровнях экспрессии одного или нескольких маркеров, описанных в настоящем описании, в определенных вариантах осуществления уровень экспрессии маркера значимо превышает минимальный предел обнаружения способа, используемого для оценки экспрессии по меньшей мере в одном биологическом образце от индивидуума со злокачественной опухолью (например, гематологической злокачественной опухолью, такой как ALL и CLL) или эталоне (например, биологическом образце от здорового индивидуума, например, индивидуума без злокачественной опухоли).

#### *Молекулы нуклеиновых кислот и зонды*

Один аспект изобретения относится к выделенным молекулам нуклеиновых кислот, которые соответствуют одному или нескольким маркерам, описанным в настоящем описании, включая нуклеиновые кислоты, которые кодируют полипептид, соответствующий одному или нескольким маркерам, описанным в настоящем описании, или часть такого полипептида. Молекулы нуклеиновых кислот включают молекулы нуклеиновых кислот, которые находятся в геномных областях, указанных в настоящем описании. Выделенные молекулы нуклеиновых кислот также включают молекулы нуклеиновых кислот, достаточные для применения в качестве зондов для гибридизации для идентификации молекул нуклеиновых кислот, которые соответствуют маркеру, описанному в настоящем описании, включая молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептид, соответствующий маркеру, описанному в настоящем описании, и фрагменты таких молекул нуклеиновых кислот, например, фрагменты, пригодные для применения в качестве ПЦР-праймеров для амплификации или мутации молекул нуклеиновых кислот. Молекулы нуклеиновых кислот могут представлять собой молекулы ДНК (например, кДНК или геномной ДНК) и молекулы РНК (например, мРНК) и аналоги ДНК или РНК, полученные с использованием нуклеотидных аналогов.

Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой двухцепочечную ДНК.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в природном источнике молекулы нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления "выделенная" молекула нуклеиновой кислоты свободна от последовательностей (таких как кодирующие белок последовательности), которые естественным образом фланкируют нуклеиновую кислоту (т.е. последовательности, расположенные на 5'- и 3'-концах нуклеиновой кислоты) в геномной ДНК организма, из которого нуклеиновая кислота происходит.

Формулировка "по существу свободный от другого клеточного материала или культуральной среды" включает препараты молекулы нуклеиновой кислоты, в которых молекула отделена от компонентов клеток, из которых она выделена или продуцирована рекомбинантными способами. Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты, которая по существу свободна от клеточного материала, включает препараты молекул нуклеиновой кислоты, имеющие менее чем приблизительно 30%, менее чем приблизительно 20%, менее чем приблизительно 10% или менее чем приблизительно 5% (в расчете на сухую массу) другого клеточного материала или культуральной среды.

Если желательно, молекулу нуклеиновой кислоты, например, продукты маркерных генов, идентифицированные в настоящем описании, можно выделять с использованием стандартных способов молекулярной биологии и информации о последовательностях в записях баз данных, описанных в настоящем описании. С использованием всех или части таких последовательностей нуклеиновых кислот молекулы нуклеиновых кислот можно выделять стандартными способами гибридизации и клонирования (например, как описано в Sambrook et al., ed., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Молекулу нуклеиновой кислоты можно амплифицировать с использованием кДНК, мРНК или геномной ДНК в качестве матрицы и соответствующих олигонуклеотидных праймеров в соответствии со стандартными способами амплификации с использованием ПЦР. Молекулы нуклеиновых кислот, амплифицированные таким образом, можно клонировать в соответствующий вектор и охарактеризовывать посредством анализа последовательности ДНК. Более того, олигонуклеотиды, соответствующие всей молекуле нуклеиновой кислоты по изобретению или ее части можно получать стандартными способами синтеза, например, с использованием автоматизированного устройства для синтеза ДНК.

Зонды на основе молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению можно использовать для обнаружения транскриптов (например, мРНК) или геномных последовательностей, соответствующих одному или нескольким маркерам, описанным в настоящем описании. Зонд содержит группу метки, связанную с ним, например, радиоактивный изотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента. Такие зонды можно использовать в качестве части набора для диагностического тестирования для идентификации клеток или тканей, которые ошибочно экспрессируют белок, например, путем измерения уровней молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, в образце клеток индивидуума, например, обнаружения уровней мРНК или определения того, является ли ген, кодирующий белок, мутантным или делетированным.

#### *Обнаружение полипептидов*

Способы количественного определения биомаркеров, описанных в настоящем

описании, включают, но не ограничиваются ими: вестерн-блоттинг, иммуноблоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA), иммунопреципитацию, поверхностный плазмонный резонанс, хемилюминесценцию, флуоресцентную поляризацию, фосфоресценцию, иммуногистохимический анализ, жидкостную хроматографию масс-спектрометрию (LC-MS), времяпролетную масс-спектрометрию с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOL), микроцитометрию, микрочипы, микроскопию, активированную флуоресценцией сортировку клеток (FACS), магнитную сортировку активированных клеток (MACS), проточную цитометрию, лазерную сканирующую цитометрию, гематологический анализатор и способы анализа на основе свойства белка, включая, но не ограничиваясь ими, связывание ДНК, связывание лиганда или взаимодействие с другими белковыми партнерами.

Активность или уровень маркерного белка также можно обнаруживать и/или количественно определять путем обнаружения или количественного определения экспрессируемого полипептида. Полипептид можно обнаруживать и количественно определять любым из ряда способов, хорошо известных специалистам в данной области. Они могут включать аналитические биохимические способы, такие как электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), тонкослойная хроматография (TLC), гипердиффузионная хроматография и т.п., или различные иммунологические способы, такие как реакции преципитина в жидкости или геле, иммунодиффузия (одинарная или двойная), иммуноэлектрофорез, радиоиммунный анализ (RIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг, иммуногистохимия и т.п. Квалифицированный специалист может без труда адаптировать известные способы обнаружения белка/антитела для применения для определения уровня одного или нескольких биомаркеров в образце сыворотки.

Другое средство для обнаружения полипептида представляет собой антитело, способное связываться с полипептидом, соответствующим маркеру, описанному в настоящем описании, например, антитело с поддающейся обнаружению меткой. Антитела могут быть поликлональными или моноклональными. Можно использовать интактное антитело или его фрагмент (например, Fab или F(ab')<sub>2</sub>). Термин "меченый" в отношении зонда или антитела охватывает прямое мечение зонда или антитела путем присоединения (т.е. физического связывания) поддающегося обнаружению вещества к зонду или антителу, а также непрямое мечение зонда или антитела посредством реактивности с другим реагентом, который является прямо меченым. Примеры непрямого мечения включают обнаружение первичного антитела с использованием флуоресцентно меченного вторичного антитела и концевое мечение ДНК-зонда биотином, так чтобы его можно было обнаружить с помощью флуоресцентно меченного стрептавидина.

В другом варианте осуществления антитело представляет собой меченое антитело, например, меченное радиоактивной меткой, меченное хромофором, меченной флуорофором или ферментативно меченное антитело. В другом варианте осуществления используют производное антитела (например, антитело, конъюгированное с субстратом или с белком или лигандом из пары белок-лиганд (например, биотин-стрептавидин)), или фрагмент антитела (например, одноцепочечное антитело, выделенный гипервариабельный домен антитела и т.д.), которые специфически связываются с белком, соответствующим маркеру, таким как белок, кодируемый открытой рамкой считывания, соответствующей маркеру, или такой как белок, который претерпел всю или часть его

нормальной посттрансляционной модификации.

Белки из клеток можно выделять с использованием способов, которые хорошо известны специалистам в данной области. Способы выделения белков могут представлять собой, например, способы, описанные в Harlow and Lane (Harlow и Lane, 5 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

В одном формате в способах можно использовать антитела или фрагменты антител, такие как вестерн-блоттинг или иммунофлуоресцентные способы, для обнаружения экспрессируемых белков. В таких применениях либо антитело, либо белки, можно 10 иммобилизовывать на твердой подложке. Подходящие твердофазные подложки или носители включают любую подложку, способную связывать антиген или антитело. Хорошо известные подложки или носители включают стекло, полистирол, полипропилен, полиэтилен, декстран, нейлон, амилазы, природные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, габбро и магнетит.

В другом варианте осуществления полипептид обнаруживают с использованием иммуноанализа. Как используют в рамках изобретения, иммуноанализ представляет собой анализ, в котором используется антитело для специфического связывания с анализируемым соединением. Таким образом, иммуноанализ характеризуется 15 обнаружением специфического связывания полипептида с антителом в противоположность применению других физических или химических свойств для выделения анализируемого соединения, нацеливания на него и количественного определения.

Полипептид обнаруживают и/или количественно определяют с использованием любого из ряда хорошо известных иммунологических анализов связывания (см., 25 например, патенты США № 4366241; 4376110; 4517288 и 4837168). Для обзора основных способов иммуноанализа также см. Asai (1993) *Methods in Cell Biology* Volume 37: *Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc. New York; Stites & Terr (1991) *Basic and Clinical Immunology* 7th Edition.

В другом варианте осуществления полипептид обнаруживают и/или количественно 30 определяют с использованием технологии анализа Luminex®. Анализ Luminex® разделяет мельчайшие кодируемые цветом гранулы, например, различные наборы, каждый из которых покрыт реагентом для конкретного биоанализа, что позволяет улавливание и обнаружение конкретных анализируемых соединений из образца мультиплексным образом. Технологию анализа Luminex® можно сравнить с мультиплексным анализом 35 ELISA с использованием флуоресцентной цитометрии на основе гранул для обнаружения анализируемых соединений, таких как биомаркеры.

Также изобретение относится к наборам для обнаружения присутствия полипептида или нуклеиновой кислоты, соответствующей маркеру, описанному в настоящем описании, в биологическом образце, например, образце, содержащем ткань, цельную 40 кровь, сыворотку, плазму, щечный соскоб, слюну, цереброспинальную жидкость, мочу, стул и костный мозг. Такие наборы можно использовать для определения того, страдает ли индивидуум или имеет ли индивидуум увеличенный риск развития злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как CLL и ALL). Например, набор может содержать меченое соединение или агент, способные 45 обнаруживать полипептид или мРНК, кодирующую полипептид, соответствующий маркеру, описанному в настоящем описании, в биологическом образце, и средства для определения количества полипептида или мРНК в образце (например, антитело, которое связывает полипептид, или олигонуклеотидный зонд, который связывается с ДНК или

мРНК, кодирующей полипептид). Наборы также могут включать инструкции для интерпретации результатов, полученных с использованием набора.

Таким образом, изобретение включает набор для оценки прогрессирования заболевания у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как CLL и ALL).

В одном варианте осуществления набор можно использовать для оценки прогрессирования злокачественной опухоли, включая, но не ограничиваясь ими, В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (В-ALL), Т-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз (Т-ALL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический миелогенный лейкоз (СМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), В-клеточный промиелоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмабластную лимфому, новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток и макроглобулинемию Вальденстрема. В одном варианте осуществления изобретение относится к набору для оценки прогрессирования заболевания у индивидуума, имеющего гематологическую злокачественную опухоль. В одном варианте осуществления изобретение относится к набору для оценки прогрессирования заболевания у индивидуума, имеющего ALL. В другом варианте осуществления изобретение относится к набору для оценки прогрессирования заболевания у индивидуума, имеющего CLL. В одном варианте осуществления изобретение относится к набору для оценки прогрессирования заболевания у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, которая ассоциирована с экспрессией CD19.

В одном варианте осуществления изобретение относится к набору для оценки и охарактеризации статуса ответа (например, полностью отвечающий индивидуум, частично отвечающий индивидуум или не отвечающий индивидуум) индивидуума, имеющего гематологическую злокачественную опухоль, на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, как описано в настоящем описании, например, такими как CTL019). В одном варианте осуществления изобретение относится к набору для оценки и охарактеризации статуса ответа (например, полностью отвечающий индивидуум, частично отвечающий индивидуум или не отвечающий индивидуум) у индивидуума, имеющего ALL, на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, как описано в настоящем описании, например, такими как CTL019). В одном варианте осуществления изобретение относится к набору для оценки и охарактеризации статуса ответа (например, полностью отвечающий индивидуум, частично отвечающий индивидуум или не отвечающий индивидуум) индивидуума, имеющего CLL, на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, как описано в настоящем описании, например, такую как CTL019).

Подходящие реагенты для связывания с полипептидом, соответствующим маркеру, описанному в настоящем описании, включают антитела, производные антител, фрагменты антител и т.п. Подходящие реагенты для связывания с нуклеиновой кислотой (например, геномной ДНК, мРНК, сплайсированной мРНК, кДНК и т.п.) включают

комплементарные нуклеиновые кислоты. Например, реагенты на основе нуклеиновых кислот включают олигонуклеотиды (меченые или немеченые), фиксированные на подложке, меченые олигонуклеотиды, не связанные с подложкой, пару праймеров для ПЦР, зонды молекулярных маяков и т.п.

5 Набор необязательно может содержать дополнительные компоненты, пригодные для проведения способов, описанных в настоящем описании. В качестве примера набор может содержать жидкости (например, буфер SSC), пригодные для гибридизации комплементарных нуклеиновых кислот или для связывания антитела с белком, с  
10 которых оно специфически связывается, одно или несколько отделений для образца и инструкции, в которых описаны характеристики способа по изобретению, эталонный образец для сравнения уровней экспрессии биомаркеров, описанных в настоящем описании, и т.п.

Набор по изобретению может содержать реагент, пригодный для определения уровня белка или белковой активности маркера.

15 В одном варианте осуществления предусматривается набор для обеспечения прогнозирования вероятности успеха терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, как описано в настоящем описании, например, такими как CTL019) у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую  
20 злокачественную опухоль, такую как CLL и ALL), причем указанный набор содержит:

набор реагентов, которые специфически определяют уровни экспрессии одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 или более) генов, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17a и/или IL-6),  
25 таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1 и сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19; и инструкции по применению указанного набора;

где в указанных инструкциях по применению описано, что, если один или несколько из обнаруженных уровней экспрессии превышает эталонный уровень, индивидуум с  
30 большей вероятностью будет положительно отвечать на терапию CAR-экспрессирующими клетками.

В одном варианте осуществления набор реагентов обнаруживает экспрессию мРНК, экспрессируемой с указанного набора генов.

35 В одном варианте осуществления набор реагентов содержит зонды нуклеиновой кислоты, комплементарные мРНК, экспрессируемой с указанного набора генов.

В одном варианте осуществления зонды нуклеиновой кислоты, комплементарные мРНК, представляют собой кДНК или олигонуклеотиды.

В одном варианте осуществления зонды нуклеиновой кислоты, комплементарные мРНК, иммобилизованы на поверхности подложки.

40 В одном варианте осуществления набор реагентов обнаруживает экспрессию полипептидов, кодируемых указанным набором генов.

#### **Терапевтические средства, композиции и введение**

Способы, описанные в настоящем описании, можно использовать для оценки статуса ответа на клетку, экспрессирующую CAR. В одном варианте осуществления клетка  
45 экспрессирует молекулу CAR, содержащую антигенсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела, которые специфически связываются с опухолевым антигеном), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен (например, внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий домен и/или

первичный сигнальный домен). В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен включает любое антитело или его фрагмент, например, scFv, известные в данной области, которые нацелены или специфически связаны с любым из опухолевых антигенов, описанных в настоящем описании. Например, опухолевый антиген 5 представляет собой ВСМА (также известный как TNFRSF17, представитель 17 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли или антиген созревания В-клеток), CD33, CLL-1 (также известен как представитель 1 семейства домена, подобного лектину С-типа, или CLECL1) или клаудин-6 (CLDN6). Антитело или его фрагмент могут 10 представлять собой антитело мыши, гуманизованное или полностью человеческое антитело или их фрагмент, например, scFv.

В одном варианте осуществления CAR содержит антитело или фрагмент антитела, которые включают связывающий CD19 домен, описанный в настоящем описании (например, антитело мыши или гуманизованное антитело или фрагмент антитела, 15 которые специфически связываются с CD19, как описано в настоящем описании), трансмембранный домен, описанный в настоящем описании, и внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании (например, внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий домен и/или первичный сигнальный домен, описанный в настоящем описании).

#### **Антигенсвязывающий домен**

20 В одном аспекте CAR по изобретению содержит специфичный к мишени связывающий элемент, иначе называемый антигенсвязывающим доменом. Выбор части зависит от типа и количества лигандов, которые определяют поверхность клетки-мишени. Например, антигенсвязывающий домен можно выбирать так, чтобы он распознавал лиганд, который выступает в качестве маркера клеточной поверхности на клетках- 25 мишенях, ассоциированного с конкретным болезненным состоянием. Таким образом, примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут выступать в качестве лигандов для антигенсвязывающего домена в CAR по изобретению, включают маркеры, ассоциированные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунными заболеваниями и злокачественными клетками.

30 В одном аспекте модифицированный посредством CAR ответ Т-клеток может быть направлен на представляющий интерес антиген посредством встраивания способами инженерии антигенсвязывающего домена, который специфически связывает желаемый антиген, в CAR.

В одном аспекте часть CAR, содержащая антигенсвязывающий домен, содержит 35 антигенсвязывающий домен, который нацелен на опухолевый антиген, например, опухолевый антиген, описанный в настоящем описании.

Антигенсвязывающий домен может представлять собой любой домен, который связывается с антигеном, включая, но не ограничиваясь ими, моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, антитело человека, 40 гуманизованное антитело и их функциональный фрагмент, включая, но не ограничиваясь ими, однодоменное антитело, такое как вариабельный домен тяжелой цепи (VH), вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен (VHH) наноантитела, происходящего из животного семейства верблюжьих, и альтернативный каркас, известный в данной области, выполняющий функцию антигенсвязывающего домена, такой как рекомбинантный фибронектиновый домен, Т-клеточный рецептор (TCR) или их фрагмент, например, одноцепочечный TCR и т.п. В некоторых случаях является полезным, чтобы антигенсвязывающий домен происходил из того же вида, в 45 котором в конечном итоге будут использовать CAR. Например, для применения у

человека может быть полезным, чтобы антигенсвязывающий домен CAR содержал остатки человека или гуманизированные остатки для антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела.

В соответствии с настоящим изобретением в данной области можно использовать любой известный CAR против CD19, например, антигенсвязывающий домен любого известного CAR против CD19. Например, можно использовать LG-740; CAR против CD19, описанный в патенте США № 8399645; патенте США № 7446190; Xu et al., *Leuk Lymphoma*. 2013 54(2):255-260(2012); Cruz et al., *Blood* 122(17):2965-2973 (2013); Brentjens et al., *Blood*, 118(18):4817-4828 (2011); Kochenderfer et al., *Blood* 116(20):4099-102 (2010); Kochenderfer et al., *Blood* 122 (25):4129-39(2013); и 16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther (ASGCT) (May 15-18, Salt Lake City) 2013, Abst 10.

Иллюстративные антигены-мишени, на которые можно осуществлять нацеливание с использованием CAR-экспрессирующих клеток, включают, но не ограничиваются ими, CD19, CD123, EGFRvIII, мезотелин, среди прочих, как описано, например, в WO 2014/130635, WO 2014/130657, и WO 2015/090230, все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

В одном варианте осуществления Т-клетка с CAR, которая специфически связывается с CD19, имеет обозначение USAN TISAGENLEUCCEL-T. CTL019 получают посредством генной модификации Т-клеток, опосредуемой стабильным встраиванием посредством трансдукции самоинактивирующимся лентивирусным (LV) вектором с дефектом репликации, содержащим трансген CTL019 под контролем промотора EF-1-альфа. CTL019 может представлять собой смесь положительных и отрицательных по трансгену Т-клеток, которые доставляют индивидууму, исходя из процента положительных по трансгену Т-клеток.

В других вариантах осуществления CAR-экспрессирующие клетки могут специфически связываться с CD19 человека, например, могут включать молекулу CAR или антигенсвязывающий домен (например, гуманизированный антигенсвязывающий домен) согласно таблице 3 WO2014/153270, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

В других вариантах осуществления CAR-экспрессирующие клетки могут специфически связываться с CD123, например, могут включать молекулу CAR (например, любую из CAR1-CAR8) или антигенсвязывающий домен согласно таблицам 1-2 WO 2014/130635, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

В других вариантах осуществления CAR-экспрессирующие клетки могут специфически связываться с EGFRvIII, например, могут включать молекулу CAR или антигенсвязывающий домен согласно таблице 2 или SEQ ID NO:11 WO 2014/130657, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

В других вариантах осуществления CAR-экспрессирующие клетки могут специфически связываться с мезотелином, например, могут включать молекулу CAR или антигенсвязывающий домен согласно таблицам 2-3 WO 2015/090230, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен содержит одну, две, три (например, все три) CDR тяжелой цепи, CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC, из антитела, приведенного выше, и/или одну, две, три (например, все три) CDR легкой цепи, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC, из антитела, приведенного выше. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи антитела, приведенного или описанного выше.



В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой опухолевый антиген, описанный в международной заявке WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из одного или нескольких из: CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (также обозначаемых как CD2 подгруппы 1, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24); подобной лектину С-типа молекулы 1 (CLL-1 или CLECL1); CD33; варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII); ганглиозид G2 (GD2); ганглиозид GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); антигена созревания В-клеток, являющегося представителем семейства рецептора TNF (BCMA); антигена Tn ((Tn Ag) или (GalNAc<sub>6</sub>-Ser/Thr)); мембранного антигена, специфичного к про-состоянию (PSMA); сиротского рецептора 1, подобного рецепторной тирозинкиназе (ROR1); Fms-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; карциноэмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); V7H3 (CD276); KIT (CD117); субъединицы альфа-2 рецептора интерлейкина-13 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; рецептора-альфа интерлейкина 11 (IL-11Ra); антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA); сериновой протеазы 21 (тестисин или PRSS21); рецептора 2 сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGFR2); антигена Льюиса (Y); CD24; рецептора-бета тромбоцитарного фактора роста (PDGFR-бета); стадийспецифического эмбрионального антигена 4 (SSEA-4); CD20; рецептора-альфа фолатов; рецепторной тирозинпротеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, ассоциированного с клеточной поверхностью (MUC1); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простазы; кислой фосфатазы предстательной железы (PAP); мутантного фактора элонгации 2 (ELF2M); эфрина B2; белка-альфа активации фибробластов (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-1), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы 9 протеасомы (просома, макропаин) бета-типа (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); онкогенного слитого белка, состоящего из области локализации сайта инициации реаранжировки (BCR) и гомолога 1 вирусного онкогена лейкоза мышей Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа-A (EphA2); фукозил-GM1; молекулы адгезии сиалил Льюиса (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена (HMWMAA); о-ацетил-GD2 ганглиозида (OAcGD2); рецептора-бета фолатов; эндотелиального опухолевого маркера 1 (TEM1/CD248); белка, родственного эндотелиальному опухолевому маркеру 7 (TEM7R); клаудина 6 (CLDN6); рецептора тиреостимулирующего гормона (TSHR); сопряженного с G-белком рецептора класса C группы 5, представителя D (GPRC5D); открытой рамки считывания 61 хромосомы X (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; специфического белка 1 плаценты (PLAC1); гексасахаридной части гликоцерамида globoH (GloboH); антигена дифференцировки молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); клеточного рецептора 1 вируса гепатита А (HAVCR1); адренорецептора-бета 3 (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); сопряженного с G-белком рецептора 20 (GPR20); комплекса лимфоцитарного антигена 6 локуса K9 (LY6K); ольфакторного рецептора 51E2 (OR51E2); белка альтернативной рамки считывания TCR-гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); антигена 1 злокачественной опухоли/яичка (NY-ESO-1); антигена 2 злокачественной опухоли/яичка (LAGE-1a); ассоциированного с меланомой антигена 1 (MAGE-A1); варианта гена 6 с транслокацией ETS, расположенного на хромосоме 12p (ETV6-AML); белка 17 спермы (SPA17);

представителя 1А семейства антигенов Х (XAGE1); рецептора 2 поверхности ангиопозитин-связывающих клеток (Tie 2); антигена-1 меланомы/яичка (MAD-CT-1); антигена-2 меланомы/яичка (MAD-CT-2); Fos-родственного антигена 1; опухолевого белка р53 (p53); мутанта р53; простеина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена 1 карциномы предстательной железы (PSTA-1 или галектин 8), антигена 1 меланомы, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MARTI); мутанта саркомы крыс (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); точек разрыва транслокации саркомы; меланомного ингибитора апоптоза (ML-IAP); ERG (слитый ген трансмембранной сериновой протеазы 2 (TMPRSS2) и ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белка парного бокса Pax-3 (PAX3); рецептора андрогенов; циклина В1; гомолога, происходящего из нейробластомы вирусного онкогена миелоцитоматоза птиц v-мус (MYCN); представителя семейства С гомологов Ras (RhoC); родственного тирозиназе белка 2 (TRP-2); цитохрома P450 1B1 (CYP1B1); белка, подобного CCCTC-связывающему фактору (белок с цинковыми пальцами) (BORIS или Brother of the Regulator of Imprinted Sites), антигена 3 плоскоклеточной карциномы, распознаваемого Т-клетками (SART3); белка парного бокса Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TES1); лимфоцитспецифической протеинтирозинкиназы (LCK); якорного белка 4 А-киназы (AKAP-4); точки разрыва 2 X синовиальной саркомы (SSX2); рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE-1); почечного убиквитарного белка 1 (RU1); почечного убиквитарного белка 2 (RU2); легумаина; вируса папилломы человека Е6 (HPV E6); вируса папилломы человека Е7 (HPV E7); кишечной карбоксилэстеразы; мутантного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; рецептора 1, подобного ассоциированному с лейкоцитами иммуноглобулину (LAIR1); Fc-фрагмента рецептора IgA (FCAR или CD89); представителя 2 подсемейства А иммуноглобулин-подобных рецепторов лейкоцитов (LILRA2); представителя F семейства белков, подобных молекуле CD300 (CD300LF); представителя А семейства 12 домена лектинов С-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2, подобного рецептору муцин-подобного гормона, содержащего EGF-подобный модуль (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); белка 5, подобного Fc-рецептору (FCRL5); и полипептида 1, подобного иммуноглобулину лямбда (IGLL1).

**Конструкции CAR против CD19**

Конструкции CAR против CD19 мыши описаны в публикации PCT WO 2012/079000, включенной в настоящее описание в качестве ссылки, и аминокислотная последовательность CAR против CD19 мыши и конструкции scFv представлены в таблице 2 ниже.

Таблица 2: Конструкции CAR против CD19 мыши

40	CTL019, полная - а.к.	SEQ ID NO: 81	MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvklliyhtsrhsgvpsrfsfgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqg ntlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirqprrkglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnksqvflk mns1qtddtaiyycahyyyggsyamdywqqgtsvtvssttppaprpptpaptias 45 qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr klllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrffpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqgn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeaysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
----	--------------------------	------------------	--

5	CTL019, scFv-до-мен	SEQ ID NO: 52	Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvkllyhtsrllhs gvpsrfsfgsgsgtdysltisnleqediатыfcqqgntlpytfgggtkleitggggs ggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqprrkgle wlgviwgsettyynsalksrlltiikdnksqvflkmnslqtddtaiyycahyyyg qsyamdywqqgtsvtvss
10	mCAR1, scFv	SEQ ID NO: 84	QVQLLESGAELVRPSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDG DTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYSCARKTISSVVDYFYDYW GQGTTVTGGGSGGGSGGGSGGGSELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNV AWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIITNVQSKDLADYFCQ YNRYPYTSFFFTKLEIKRRS
15	mCAR1, полный - а.к.	SEQ ID NO: 85	QVQLLESGAELVRPSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDG DTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYSCARKTISSVVDYFYDYW GQGTTVTGGGSGGGSGGGSGGGSELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNV AWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIITNVQSKDLADYFCQ YNRYPYTSFFFTKLEIKRRSKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPFG PSKPFWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMPRRPGPTRK HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRG RDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDLYDALHMQALPPR
20	mCAR2, scFv	SEQ ID NO: 86	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKKLIYHTSRLLHS GVPSRFSFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSG SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVWIGSETTYNSALKSRLLTIKDNKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQTSVTVSSE
25	mCAR2, CAR - а.к.	SEQ ID NO: 87	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKKLIYHTSRLLHS GVPSRFSFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSG SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVWIGSETTYNSALKSRLLTIKDNKSQVFLKMNSLQTDDTAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSESKYGPCCPPCFWVLVVGGLVACYSLL LVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGDRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPRL
35	mCAR2, полный - а.к.	SEQ ID NO: 88	DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKKLI YHTSRLLHSGV PSRFSFGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVWIG SETTYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPCPM FWVLVVGGLV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFE EEEGGCELRV KFSRSADAPA YQQGQNQLYN ELNLRREEY DVLDRRGDRD PEMGGKPRRK NPQEGLYNEL QKDKMAEAYS EIGMKGERRR GKGGHDGLYQG LSTATKDYD ALHMQALPPR LEGGGEGRGS LLTCGDVEEN PGPRMLLLVT SLLLCELPH AFLIPRKVC NGIGIGEFKD SLSINATNIK HFKNCTISIG DLHILPVAFR GDSFTHTPPL DPQELDILKT VKEITGFLLI QAWPENRTDL HAFENLEIR GRTKQHGFQFS LAVVSLNITS LGLRSLKEIS DGDVIISGNK NLCYANTINW KKLFGTSGQK TKIISNRGEN SCKATGQVCH ALCSPGCVG PEPRDCVSCR NVSREGRECV KNCNLEGEPR EFDVENSECIQ CHPECLPQAM NITCTGRGPD NCIQCAHYID GPHCVKTCPA GVMGENNTLV WKYADAGHVC HLCHPNCTYG CTGPGLEGCP TNGPKIPSIA TGMVGALLLL LVVALGIGLF M
40			45

5 mCAR3, scFv	SEQ ID NO: 89	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGWSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHY YGGSYAMDYWGQGT SVTVSS
10 mCAR3, полный - а.к.	SEQ ID NO: 90	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGWSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHY YGGSYAMDYWGQGT SVTVSSAAAEVMPYPPYLDNEKSNGT I IHVKGKHLCP SPL FPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVTVAF I IFWVRSKR S RLLHSDYMNMT PRRP GP TRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNL YNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

15 Конструкции CAR против CD19, содержащие гуманизированные домены scFv против CD19, описаны в публикации PCT WO 2014/153270, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

20 В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен включает антитело против CD19 или его фрагмент, например, scFv. Например, антигенсвязывающий домен включает переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, приведенную в таблице 12. Линкерная последовательность, связывающая переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, может представлять собой, например, любую из линкерных последовательностей, описанных в настоящем описании, или альтернативно она может представлять собой GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID  
25 NO: 45).

Таблица 12: Связывающие домены антитела против CD19

30 CD19	huscFv1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIKG GGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PGKGLEWIGVIWGWSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 24)
35 CD19	huscFv2	Eivmtqspatls lspgeratls crasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyht srlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkcleikggggsggg gggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviw ttyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycahyyygggyamdywq lvtvss (SEQ ID NO: 25)
40 CD19	huscFv3	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsetty ssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycahyyygggyamdywqggtlvtv sggggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratls crasqdiskylnw yqqkpgq aprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgq gtleik (SEQ ID NO: 26)
45 CD19	huscFv4	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsetty qsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycahyyygggyamdywqggtlvtv sggggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratls crasqdiskylnw yqqkpgq aprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgq gtleik (SEQ ID NO: 27)
45 CD19	huscFv5	Eivmtqspatls lspgeratls crasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyht srlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkcleikggggsgggsg gggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigv iwsettyysslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycahyyygggyamdy wqggtlvtvss (SEQ ID NO: 39)

5	CD19	huscFv6	Eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgip arfsgsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpytfgqgkkleik <u>ggggsgggsg</u> <u>ggsgggsgqvqlqesgpglvkps</u> etlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigv iwgsettyyqsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdy waaatlvtvss (SEQ ID NO: 43)
10	CD19	huscFv7	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyy ssslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtv ssgggsgggsgggsgggsggggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyq qkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpy tfaaatkleik (SEQ ID NO: 46)
10	CD19	huscFv8	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyy qsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtv ssgggsgggsgggsgggsggggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyq qkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpy tfaaatkleik (SEQ ID NO: 47)
15	CD19	huscFv9	Eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgip arfsgsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpytfgqgkkleik <u>ggggsgggsg</u> <u>ggsgggsgqvqlqesgpglvkps</u> etlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigv iwgsettyynsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdy wgqgtlvtvss (SEQ ID NO: 48)
20	CD19	HuscFv10	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyy nsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtv ssgggsgggsgggsgggsggggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyq qkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpy tfaaatkleik (SEQ ID NO: 49)
25	CD19	HuscFv11	Eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgip arfsgsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpytfgqgkkleik <u>ggggsgggsg</u> <u>ggsgqvqlqesgpglvkps</u> etlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgse ttyynsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgt lvtvss (SEQ ID NO: 50)
25	CD19	HuscFv12	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyy nsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtv ssgggsgggsgggsgggsggggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgq aprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpytfgqg tkleik (SEQ ID NO: 51)
30	CD19	muCTLO19	Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvkllyhtsrhsgvp srfsgsgsgtdysltisnleqediатыfcqqgntlpytfggkkleit <u>ggggsgggsg</u> <u>gggsevklqesgpglvapsqslsvt</u> ctvsgvslpdygvswirqpprkglewlgviwgse ttyynsalksrltiikdsksqvflkmnslqtddtaiyycahyyyggsyamdywgqgt svtvss (SEQ ID NO: 52)
35	CD19	После-дова-тель- ность VH SSJ25- C1	QVQLLESGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTN YNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYSCARKTISSVDFYFDYWGQGTTV T (SEQ ID NO: 53)
35	CD19	После-дова-тель- ность VL SSJ25- C1	ELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGGINVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVP DRFTGSGSGTDFLTITINVQSKDLADYFYFCQYNRYPYTSGGGKLEIKRRS (SEQ ID NO: 54)

В соответствии с настоящим изобретением в данной области можно использовать любой известный CAR против CD19, например, антигенсвязывающий домен любого известного CAR против CD19. Например, можно использовать LG-740; CAR против CD19, описанный в патенте США № 8399645; патенте США № 7446190; Xu et al., Leuk Lymphoma. 2013 54(2): 255-260(2012); Cruz et al., Blood 122(17): 2965-2973 (2013); Brentjens et al., Blood, 118(18): 4817-4828 (2011); Kochenderfer et al., Blood 116(20): 4099-102 (2010); Kochenderfer et al., Blood 122 (25): 4129-39(2013); и 16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther (ASGCT) (May 15-18, Salt Lake City) 2013, Abst 10.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен содержит одну, две, три (например, все три) CDR тяжелой цепи, CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC, из антитела, приведенного выше, и/или одну, две, три (например, все три) CDR легкой цепи, CDR1

LC, CDR2 LC и CDR3 LC, из антитела, приведенного выше. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи антитела, приведенного или описанного выше.

5 В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен против CD22 представляет собой антигенсвязывающую часть, например, CDR, антитела, описанного, например, в Naso et al., Blood, 121(7): 1165-1174 (2013); Wayne et al., Clin Cancer Res 16(6): 1894-1903 (2010); Kato et al., Leuk Res 37(1): 83-88 (2013); Creative BioMart (creativebiomart.net): MOM-18047-S(P).

10 В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен против CD20 представляет собой антигенсвязывающую часть, например CDR, антитела ритуксимаба, офатумумаба, окрелизумаба, велтузумаба или GA101.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен против ROR1 представляет собой антигенсвязывающую часть, например CDR, антитела, описанного  
15 в настоящем описании, например, Hudecek et al., Clin Cancer Res 19(12): 3153-3164 (2013); WO 2011159847 и US20130101607.

#### *Биспецифические CAR*

В одном варианте осуществления мультиспецифическая молекула антитела представляет собой биспецифическую молекулу антитела. Биспецифическое антитело  
20 обладает специфичностью в отношении более чем двух антигенов. Биспецифическая молекула антитела характеризуется первой последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и второй последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном  
25 варианте осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы перекрываются. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы не перекрываются. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, например,  
30 различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления биспецифическая молекула антитела содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания с первым эпитопом, и последовательность переменного домена тяжелой цепи и  
35 последовательность переменного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания со вторым эпитопом. В одном варианте осуществления биспецифическая молекула антитела содержит половинное антитело, обладающее специфичностью связывания с первым эпитопом, и половинное антитело, обладающее специфичностью связывания со вторым эпитопом. В одном варианте осуществления биспецифическая молекула антитела содержит половинное антитело или его фрагмент,  
40 обладающие специфичностью связывания с первым эпитопом, и половинное антитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания со вторым эпитопом. В одном варианте осуществления биспецифическая молекула антитела содержит scFv или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания с первым эпитопом, и scFv  
45 или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания со вторым эпитопом.

В определенных вариантах осуществления молекула антитела представляет собой мультиспецифическую (например, биспецифическую или триспецифическую) молекулу антитела. Протоколы получения биспецифических или гетеродимерных молекул антител

и различных конфигураций биспецифических молекул антител описаны, например, в абзацах 455-458 WO2015/142675, поданной 13 марта 2015, которая включена в качестве ссылки в полном объеме.

В одном аспекте биспецифическая молекула антитела характеризуется первой последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, например scFv, которая обладает специфичностью связывания с CD19, например, содержит scFv, как описано в настоящем описании, или содержит CDR легкой цепи и/или CDR тяжелой цепи из scFv, описанного в настоящем описании, и второй последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания со вторым эпитопом на другом антигене.

#### *Химерный TCR*

В одном аспекте антитела и фрагменты антител по настоящему изобретению (например, антитела против CD19 и фрагменты) можно пересаживать в один или несколько константных доменов цепи Т-клеточного рецептора ("TCR"), например, цепи TCR-альфа или TCR-бета, с получением химерного TCR. Без связи с теорией, полагают, что при связывании антигена химерные TCR передают сигнал через комплекс TCR. Например, scFv, как описано в настоящем описании, можно пересаживать в константный домен, например, по меньшей мере часть внеклеточного константного домена, трансмембранного домена и цитоплазматического домена цепи TCR, например, цепи TCR-альфа и/или цепи TCR-бета. В качестве другого примера, фрагмент антитела, например, VL-домен, как описано в настоящем описании, можно трансплантировать в константный домен цепи TCR-альфа, и фрагмент антитела, например, VH-домен, как описано в настоящем описании, можно трансплантировать в константный домен цепи TCR-бета (или альтернативно VL-домен можно трансплантировать в константный домен цепи TCR-бета и VH-домен можно трансплантировать в цепь TCR-альфа). В качестве другого примера CDR антитела или фрагмента антитела можно трансплантировать в цепь TCR-альфа и/или бета с получением химерного TCR. Например, LCDR, описанные в настоящем описании, можно трансплантировать в вариабельный домен цепи TCR-альфа и HCDR, описанные в настоящем описании, можно трансплантировать в вариабельный домен цепи TCR-бета, или наоборот. Такие химерные TCR можно получать, например, способами, известными в данной области (например, Willemsen RA et al., Gene Therapy 2000; 7: 1369-1377; Zhang T et al, Cancer Gene Ther 2004; 11: 487-496; Aggen et al, Gene Ther. 2012 Apr; 19(4):365-74).

#### *Неантительные каркасы*

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит неантительный каркас, например, фибронектин, анкирин, доменное антитело, липокалин, малое модульное иммунофармацевтическое средство, максиантитело, белок А или аффилин. Неантительный каркас обладает способностью связываться с антигеном-мишенью на клетке. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой полипептид встречающегося в природе белка, экспрессируемого на клетке, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает неантительный каркас. Можно использовать широкое множество неантительных каркасов при условии, что полученный полипептид включает по меньшей мере одну связывающую область, которая специфически связывается с антигеном-мишенью на клетке-мишени.

Неантительные каркасы включают: фибронектин (Novartis, MA), анкирин (Molecular Partners AG, Zurich, Швейцария), доменные антитела (Domantis, Ltd., Cambridge, MA, и Ablynx nv, Zwijnaarde, Бельгия), липокалин (Pieris Proteolab AG, Freising, Германия),



маломодульные иммунофармацевтические средства (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), максиантитела (Avidia, Inc., Mountain View, CA), белок А (Affibody AG, Швеция) и аффилин (гамма-кристаллин и убиквитин) (Scil Proteins GmbH, Halle, Германия).

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен содержит внеклеточный домен, или его противоположный лиганд-связывающий фрагмент, молекулы, которая связывает противоположный лиганд на поверхности клетки-мишени.

#### **Трансмембранный домен**

В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в настоящем описании, содержит трансмембранный домен, который слит с внеклеточной последовательностью, например, внеклеточным распознающим элементом, который может содержать антигенсвязывающий домен. В одном варианте осуществления трансмембранный домен представляет собой домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В другом варианте осуществления трансмембранный домен представляет собой домен, который не естественным образом связан с одним из доменов в CAR.

Трансмембранный домен может включать одну или несколько дополнительных аминокислот, соседних с трансмембранной областью, например, одну или несколько аминокислот, ассоциированных с внеклеточной областью белка, из которого происходит трансмембранный домен (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 вплоть до 15 аминокислот внеклеточной области) и/или одну или несколько дополнительных аминокислот, ассоциированных с внутриклеточной областью белка, из которой происходит трансмембранный белок (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 вплоть до 15 аминокислот внутриклеточной области).

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой домен, который минимизирует взаимодействия с другими элементами, например, другими трансмембранными доменами. В некоторых случаях трансмембранный домен минимизирует связывание таких доменов с трансмембранными доменами тех же ли отличающихся поверхностных мембранных белков, например, для минимизации взаимодействий с другими представителями рецепторного комплекса. Подходящие примеры могут быть получены путем выбора или модификации посредством аминокислотной замены известного трансмембранного домена. В одном варианте осуществления трансмембранный домен способен стимулировать гомодимеризацию с другим CAR на клеточной поверхности.

Трансмембранный домен может содержать встречающуюся в природе или не встречающуюся в природе синтетическую последовательность. Когда он является встречающимся в природе, трансмембранный домен может происходить из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка.

Трансмембранные области, пригодные для применения в молекулах, описанных в настоящем описании, могут происходить из любого одного или нескольких, например, из альфа-, бета- или зета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может включать по меньшей мере трансмембранную область(и), например, из KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R $\alpha$ , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1,



CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C или CD19. В одном варианте осуществления трансмембранный домен происходит из CD8. В одном варианте осуществления трансмембранный домен происходит из CD28. В одном аспекте трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из последовательности, приведенной в качестве SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 42.

В одном варианте осуществления последовательность, например, между трансмембранным доменом и другой последовательностью или доменом, с которыми он слит, может находиться последовательность шарнирной области или спейсера. В некоторых вариантах осуществления также можно использовать различные шарнирные области человека (также называемые "спейсерами"), например, включая, но не ограничиваясь ими, шарнирную область Ig (иммуноглобулина) человека. Необязательно, короткий олигопептидный или полипептидный линкер длиной от 2 до 10 аминокислот может образовывать связь между трансмембранным доменом и другим доменом, например, внутриклеточным сигнальным доменом или костимулирующим доменом CAR. Дублет глицин-серин является особенно подходящим линкером. В одном аспекте шарнирная область или спейсер представляют собой аминокислотную последовательность, предоставленную в качестве SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 8. В одном аспекте шарнирная область или спейсер содержат шарнирную область KIR2DS2.

В одном варианте осуществления трансмембранный домен может представлять собой не встречающуюся в природе последовательность, и в этом случае он может содержать в основном гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В одном варианте осуществления на каждом конце трансмембранного домена находится триплет фенилаланина, триптофана и валина.

Необязательно, короткий олигопептидный или полипептидный линкер длиной от 2 до 10 аминокислот может образовывать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматической областью CAR. Дублет глицин-серин является особенно подходящим линкером. Например, в одном аспекте линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления линкер кодируется нуклеотидной последовательностью GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 11).

#### **Цитоплазматический домен**

Цитоплазматический домен или область CAR включает внутриклеточный сигнальный домен. Внутриклеточный сигнальный домен обычно ответственен за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которую введен CAR.

Примеры внутриклеточных сигнальных доменов для применения в CAR по изобретению включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и корецепторов, которые действуют совместно для инициации передачи сигнала после связывания рецептором антигена, а также любое производное или вариант этих последовательностей и любую рекомбинантную последовательность, которая имеет ту же функциональную способность.

Известно, что сигналы, индуцируемые TCR отдельно, являются недостаточными для полной активации Т-клеток, и что также требуется вторичный и/или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно считать, что активация Т-клеток опосредуется двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: последовательности, которые иницируют антигензависимую первичную активацию

через TCR (первичные внутриклеточные сигнальные домены), и последовательности, которые действуют независимым от антигена образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий (вторичный цитоплазматический домен, например, костимулирующий домен).

5 *Первичный сигнальный домен*

Первичный цитоплазматический сигнальный домен регулирует первичную активацию комплекса TCR либо стимулирующим путем, либо ингибиторным путем. Первичные внутриклеточные сигнальные домены, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы, или ITAM.

10 Примеры содержащих ITAM первичных внутриклеточных сигнальных доменов, которые особенно применимы в рамках изобретения, включают сигнальные домены TCR-зета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известный как "ICOS"), FcεRI, DAP10, DAP12 и CD66d. В  
15 одном варианте осуществления CAR по изобретению содержит внутриклеточный сигнальный домен, например, первичный сигнальный домен CD3-зета, например, последовательность CD3-зета, описанную в настоящем описании.

В одном варианте осуществления первичный сигнальный домен содержит модифицированный домен ITAM, например, мутантный домен ITAM, который имеет  
20 измененную (например, увеличенную или сниженную) активность по сравнению с нативным доменом ITAM. В одном варианте осуществления первичный сигнальный домен содержит модифицированный ITAM-содержащий первичный внутриклеточный сигнальный домен, например, оптимизированный и/или укороченный ITAM-содержащий первичный внутриклеточный сигнальный домен. В одном варианте осуществления  
25 первичный сигнальный домен содержит один, два, три, четыре или более мотивов ITAM. Следующие примеры молекул, содержащих первичный внутриклеточный сигнальный домен, которые являются особенно пригодными для применения в рамках настоящего изобретения, включают DAP10, DAP12 и CD32.

Первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит функциональный фрагмент или аналог первичной стимулирующей молекулы (например, CD3-зета - номер доступа  
30 GenBank № BAG36664.1). Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать целую внутриклеточную область или фрагмент внутриклеточной области, которые являются достаточными для индукции внутриклеточного сигнала, когда антигенсвязывающий домен, с которым он слит, связывает распознаваемый им антиген.  
35 В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичностью последовательности с целой внутриклеточной областью или фрагментом внутриклеточной области, который является достаточным для индукции  
40 внутриклеточного сигнала, встречающейся в природе стимулирующей молекулы, например, внутриклеточной первичной стимулирующей молекулы человека (номер доступа GenBank № BAG36664.1) или другого млекопитающего, например, не являющегося человеком вида, например, грызуна, мартышки, человекообразной обезьяны или мыши. В некоторых вариантах осуществления первичный  
45 внутриклеточный сигнальный домен обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью или отличается не более чем на 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток

от соответствующих остатков целой внутриклеточной области или фрагмента внутриклеточной области, который является достаточным для индукции внутриклеточного сигнала, встречающейся в природе первичной стимулирующей молекулы человека, например, встречающейся в природе первичной стимулирующей молекулы, описанной в настоящем описании.

*Костимулирующий сигнальный домен*

Внутриклеточный сигнальный домен CAR может содержать сигнальный домен CD3-зета сам по себе или в комбинации с любым другим желаемым внутриклеточным сигнальным доменом(ами), пригодным в контексте CAR по изобретению. Например, внутриклеточный сигнальный домен CAR может содержать часть в виде цепи CD3-зета и костимулирующий сигнальный домен. Костимулирующий сигнальный домен относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. В одном варианте осуществления внутриклеточный домен сконструирован так, чтобы он содержал сигнальный домен CD3-зета и сигнальный домен CD28. В одном аспекте внутриклеточный домен сконструирован так, чтобы он содержал сигнальный домен CD3-зета и сигнальный домен ICOS.

Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличную от рецептора антигена или его лигандов, которая требуется для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Примеры таких молекул включают молекулу MHC класса I, белки рецепторов TNF, иммуноглобулин-подобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, рецептор Toll-лигана, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM 1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т.п. Например, было продемонстрировано, что костимуляция CD27 усиливает экспансию, эффекторную функцию и выживаемость клеток, экспрессирующих CAR человека (например, Т-клеток, NK-клеток) *in vitro* и усиливает персистенцию и противоопухолевую активность Т-клеток *in vivo* (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706). Следующие примеры таких костимулирующих молекул включают CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM 1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKG2D и NKG2C.

Внутриклеточные сигнальные домены в цитоплазматической части CAR по изобретению могут быть связаны друг с другом в случайном или определенном порядке. Необязательно короткий олиго- или полипептидный линкер, например, длиной от 2 до

10 аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот), может образовывать связь между внутриклеточными сигнальными последовательностями. В одном варианте осуществления в качестве подходящего линкера можно использовать дублет глицин-серин. В одном варианте осуществления в качестве подходящего линкера можно

5 использовать одну аминокислоту, например, аланин, глицин.

В одном аспекте внутриклеточный сигнальный домен сконструирован так, чтобы он содержал два или более, например, 2, 3, 4, 5 или более, костимулирующих сигнальных доменов. В одном варианте осуществления два или более, например, 2, 3, 4, 5 или более, костимулирующих сигнальных доменов, разделены линкерной молекулой, например

10 линкерной молекулой, описанной в настоящем описании. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит два костимулирующих сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления линкерная молекула представляет собой остаток глицина. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой остаток аланина.

15 Костимулирующий домен содержит функциональный фрагмент или аналог костимулирующей молекулы (например, ICOS, CD28 или 4-1BB). Он может содержать всю внутриклеточную область или фрагмент внутриклеточной области, который является достаточным для индукции внутриклеточного сигнала, например, когда антигенсвязывающий домен, с которым он слит, связывает распознаваемый им антиген.

20 В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен обладает по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с целой внутриклеточной областью или фрагментом внутриклеточной области, который является достаточным для индукции внутриклеточного сигнала, встречающейся в природе костимулирующей молекулы, как описано в настоящем описании, например,

25 внутриклеточной костимулирующей молекулы человека или другого млекопитающего, например, не являющегося человеком вида, например, грызуна, мартышки, человекообразной обезьяны или мыши. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен обладает по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ

30 ID NO: 40 или SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью или отличается не более чем на 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от соответствующих остатков целой внутриклеточной области или фрагмента

35 внутриклеточной области, который является достаточным для индукции внутриклеточного сигнала, встречающейся в природе костимулирующей молекулы человека, например, встречающейся в природе костимулирующей молекулы человека, описанной в настоящем описании.

Любые из CAR, описанных в настоящем описании, могут включать один или

40 несколько компонентов, приведенных в таблице 11.

Таблица 11. Последовательности различных компонентов CAR (а.к. - аминокислоты, н.к. - нуклеиновые кислоты, которые кодируют соответствующий белок)

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
-----------	----------	--------------------

45

5

10

15

20

25

30

35

40

45

1	Промотор EF-1	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCACTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCC CCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGG TGGCGCGGGGTAAGTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTC CCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTT TTTTTCGCAACGGGTTTCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTC CCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTT CCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGG GTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCCTGA GTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCAC CTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGA TGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCC AAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCCGGGCGGCACGGGG CCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGC CACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGC CTGGCCTCGCGCCCGCTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCC GGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTG CAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGA GTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGT GACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCGAGCT TTTGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGT TTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT GTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGATCTTGTTTCATTCTCAA GCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTCAGGTGTCGTGA
2	Лидерная последовательность (а.к.)	MALPVTALLPLALLHAARP
3	Лидерная последовательность (н.к.)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGC CGCTAGACCC
4	Шарнирная область CD8 (а.к.)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
5	Шарнирная область CD8 (н.к.)	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCG CAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCA GTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT
6	Шарнирная область IgG4 (а.к.)	ESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGKM
7	Шарнирная область IgG4 (н.к.)	GAGAGCAAGTACGGCCCTCCTGCCCCCTTGCCTGCCCCGAGTTCCTGG GCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCCGGACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGA CCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGC CAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTG CGTGCTGACCGTGTGCAACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTG TAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAA GGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCTAGCCA AGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTT CTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAA CAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTG TACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTT AGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCC TGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

5	8	Шарнирная область IgD (а.к.)	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGLAKATTAPATTRNTGRGGEEKK EERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLI VAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCT RLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILL EVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVS NASRSLEVSIVTDH
10	9	Шарнирная область IgD (н.к.)	AGGTGGCCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCTACTGCACAGC CCCAGGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCG CAATACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAA GAACAGGAAGAGAGGGGAGACCAAGACCCTGAATGTCCATCCCATACCCAG CCGCTGGGCGTCTATCTTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAG ATAAGGCCACCTTACATGTTTCGTGCTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCA TTTGACTTGGGAGGTTGCCGAAAGGTACCCACAGGGGGGGTGTAGGAAG GGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGACTCAC CCTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTACATGTACTCTAAATC ATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCA GGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCAGAG GCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTAGCCGCCAACATCT TGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCGCTC CAGCCCCGCCCCACCCAGCCGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGT CTTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTT GTGTCCCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAG GTTTCTACGTGACTGACCATT
25	10	Шарнирная область/линкер GS (а.к.)	GGGGSGGGGS
25	11	Шарнирная область/линкер GS (н.к.)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
	12	CD8TM (а.к.)	IYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
	13	CD8TM (н.к.)	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACT GGTTATCACCTTTACTGC
30	14	Внутриклеточный домен 4-1BB (а.к.)	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
	15	Внутриклеточный домен 4-1BB (н.к.)	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC CAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAG AAGAAGAAGGAGGATGTGAAGT
35	16	CD27 (а.к.)	ORRKYRSNKGESVPEAEPCRYSCPREEEGSTIPIOEDYRKPEPACSP
35	17	CD27 (н.к.)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTACTACATGAACATGACTCCC CGCCGCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCG ACTTCGCAGCCTATCGCTCC
40	18	CD3-зета (а.к.)	RVKFSRSADAPAYKQGQNLQYLNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
45	19	CD3-зета (н.к.)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACAAGCAGGGCCA GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGT TTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAA GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGG CGGAGGCCTACAGTGAAGTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAG GGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC GACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
	20	CD3-зета (а.к.)	RVKFSRSADAPAYQGGQNLQYLNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMOAI PPR

5	21	CD3-зета (н.к.)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCAGGGCCA GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGT TTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAA GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGG CGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAG GGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC GACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
	22	линкер	GGGGS
	23	линкер	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
10	28	Линкер	(Gly-Gly-Gly-Ser) <sub>n</sub> , где n=10
	29	Линкер	(Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>4</sub>
	30	Линкер	(Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>3</sub>
	31	Линкер	(Gly <sub>3</sub> Ser)
15	32	Поли-А	A <sub>2000</sub>
	33	Поли-А	A <sub>150</sub>
	34	Поли-А	A <sub>5000</sub>
	35	Поли-Т	T <sub>100</sub>
	36	Поли-Т	T <sub>5000</sub>
	37	Поли-А	A <sub>64</sub>
20	38	Поли-А	A <sub>400</sub>

### Комбинация CAR

В одном аспекте экспрессирующая CAR клетка, описанная в настоящем описании, может дополнительно содержать второй CAR, например, второй CAR, который включает другой антигенсвязывающий домен, например, для той же мишени или другой мишени (например, мишень, отличная от ассоциированного со злокачественной опухолью антигена, описанного в настоящем описании, другой ассоциированной со злокачественной опухолью антиген, описанный в настоящем описании, например, CD19, CD33, CLL-1, CD34, FLT3 или рецептор-бета фолатов). В одном варианте осуществления второй CAR включает антигенсвязывающий домен для мишени, экспрессируемой тем же типом злокачественных клеток, что и ассоциированный со злокачественной опухолью антиген. В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующая клетка содержит первый CAR, который нацелен на первый антиген, и включает внутриклеточный сигнальный домен, имеющий костимулирующий сигнальный домен, но не первичный сигнальный домен, и второй CAR, который нацелен на второй отличающийся антиген и включает внутриклеточный сигнальный домен, имеющий первичный сигнальный домен, но не костимулирующий сигнальный домен. Без связи с теорией, размещение костимулирующего сигнального домена, например, 4-1BB, CD28, ICOS, CD27 или OX-40, на первом CAR, и первичного сигнального домена, например, CD3-зета, на втором CAR может ограничить активность CAR клетками, в которых экспрессируются обе мишени. В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующая клетка содержит первый CAR к ассоциированному со злокачественной опухолью антигену, который включает антигенсвязывающий домен, который связывает антиген-мишень, описанный в настоящем описании, трансмембранный домен и костимулирующий домен, и второй CAR, который нацелен на другой антиген-мишень (например, антиген, экспрессируемый на том же типе злокачественных клеток, что и первый антиген-мишень) и включает антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и первичный сигнальный домен. В другом варианте осуществления CAR-экспрессирующая клетка содержит первый CAR, который включает

антигенсвязывающий домен, который связывает антиген-мишень, описанный в настоящем описании, трансмембранный домен и первичный сигнальный домен, и второй CAR, который нацелен на антиген, отличный от первого антигена-мишени (например, антиген, экспрессируемый на том же типе злокачественных клеток, что и первый антиген-мишень), и включает антигенсвязывающий домен против антигена, трансмембранный домен и костимулирующий сигнальный домен.

В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующая клетка содержит CAR, описанный в настоящем описании (например, CAR против CD19) и ингибиторный CAR. В одном варианте осуществления ингибиторный CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген, обнаруживаемый на нормальных клетках, но не на злокачественных клетках, например, нормальных клетках, которые также экспрессируют CLL. В одном варианте осуществления ингибиторный CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен ингибиторной молекулы. Например, внутриклеточный домен ингибиторного CAR может представлять собой внутриклеточный домен PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAL9, аденозина и TGFR (например, TGFR-бета).

В одном варианте осуществления, когда экспрессирующая CAR клетка содержит два или более различных CAR, антигенсвязывающие домены различных CAR могут быть такими, что антигенсвязывающие домены не взаимодействуют друг с другом. Например, клетка, экспрессирующая первый и второй CAR, может иметь антигенсвязывающий домен первого CAR, например, в качестве фрагмента, например scFv, который не образует связи с антигенсвязывающим доменом второго CAR, например, антигенсвязывающий домен второго CAR представляет собой VHH.

В некоторых вариантах осуществления связывание антигенсвязывающего домена первого CAR, когда он присутствует на поверхности клетки, с распознаваемым им антигеном по существу не снижается в присутствии второго CAR. В некоторых вариантах осуществления связывание антигенсвязывающего домена первого CAR с распознаваемым им антигеном в присутствии второго CAR составляет 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от связывания антигенсвязывающего домена первого CAR с его собственным антигеном в отсутствие второго CAR.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены первого CAR и указанного второго CAR, когда они присутствуют на поверхности клетки, связываются друг с другом в меньшей степени, чем в случае, если бы они оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены первого CAR и второго CAR связываются друг с другом на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньше, чем в случае, если бы они оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv.

#### **CAR-экспрессирующие клетки**

CAR, описанные в настоящем описании, экспрессируются на клетках, например, иммунных эффекторных клетках, например, Т-клетках. Например, конструкцией нуклеиновой кислоты CAR, описанного в настоящем описании, трансдуцируют Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, описанные в настоящем описании, представляют собой Т-клетки с транскрибированной *in vitro* РНК CAR.

#### **Источники клеток, например Т-клеток**



Перед увеличением в количестве и генетической модификацией или другой модификацией источник клеток, например, иммунных эффекторных клеток, Т-клеток или НК-клеток, можно получать от индивидуума. Примеры индивидуумов включают человека, мартышек, шимпанзе, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенные виды. Т-клетки можно получать из ряда источников, включая моноклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из области инфекции, асцитную жидкость, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные, как описано в этом разделе, подвергаются анализу, описанному в настоящем описании, например, анализируют один или несколько биомаркеров.

В определенных аспектах настоящего изобретения иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки или НК-клетки, можно получать из единицы крови, взятой от индивидуума, с использованием любого из множества способов, известных квалифицированному специалисту, таких как разделение в Ficoll™. В одном аспекте клетки из циркулирующей крови индивидуума получают аферезом. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В одном аспекте клетки, полученные аферезом, можно промывать для удаления фракции плазмы и, необязательно, для помещения клеток в соответствующий буфер или среды для последующих стадий обработки. В одном варианте осуществления клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В альтернативном варианте осуществления промывочный раствор лишен кальция и может быть лишен магния или может быть лишен многих, или даже всех, двухвалентных катионов.

Первоначальные стадии активации в отсутствие кальция могут приводить к усиленной активации. Как будет хорошо понятно специалистам в данной области, стадию промывания можно проводить способами, известными в данной области, как например, с использованием полуавтоматической "проточной" центрифуги (например, устройство для обработки клеток Cobe 2991, Baxter CytoMate, или Haemonetics Cell Saver 5) в соответствии с инструкциями изготовителя. После промывания клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах, например, таких как не содержащий Ca, не содержащий Mg PBS, PlasmaLyte A, или другой солевой раствор с буфером или без него. Альтернативно нежелательные компоненты образца для афереза можно удалять и клетки прямо ресуспендировать в культуральной среде.

Является общепризнанным, что в способах применения можно использовать условия культуральных сред, включающие 5% или менее, например 2%, сыворотки человека АВ, и в них используются известные условия культуральных сред и композиции, например, описанные в Smith et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" *Clinical & Translational Immunology* (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31.

В одном аспекте Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови человека посредством лизиса эритроцитов и устранения моноцитов, например, посредством центрифугирования в градиенте PERCOLL™ или посредством центрифужной элютриации в противотоке.

Способы, описанные в настоящем описании, могут включать, например, селекцию конкретной субпопуляции иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, которые представляют собой популяцию с истощением регуляторных Т-клеток, популяцию с истощением CD25+ клеток, с использованием, например, способа отрицательной селекции, например, описанного в настоящем описании. В некоторых вариантах

осуществления, популяция клеток с истощением регуляторных Т-клеток содержит менее 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% CD25+ клеток.

В одном варианте осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки, устраняют из популяции с использованием антитела против CD25 или его фрагмента, или CD25-связывающего лиганда, IL-2. В одном варианте осуществления антитело против CD25 или его фрагмент, или CD25-связывающий лиганд конъюгированы с подложкой, например, гранулами, или в другом случае нанесены на субстрат, например, гранулы. В одном варианте осуществления антитело против CD25 или его фрагмент конъюгированы с подложкой, как описано в настоящем описании.

В одном варианте осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки, удаляют из популяции с использованием реагента для истощения CD25 от Miltenyi™. В одном варианте осуществления соотношение клеток и реагента для истощения CD25 составляет  $1e7$  клеток на 20 мкл, или  $1e7$  клеток на 15 мкл, или  $1e7$  клеток на 10 мкл, или  $1e7$  клеток на 5 мкл, или  $1e7$  клеток на 2,5 мкл, или  $1e7$  клеток на 1,25 мкл. В одном варианте осуществления, например, для регуляторных Т-клеток, например, используют истощение CD25+ клеток, превышающих 500 миллионов клеток/мл. В следующем аспекте, используют концентрацию клеток, составляющую 600, 700, 800 или 900 миллионов клеток/мл.

В одном варианте осуществления популяция иммунных эффекторных клеток, подлежащих истощению, включает приблизительно  $6 \times 10^9$  CD25+ Т-клеток. В других аспектах популяция иммунных эффекторных клеток, подлежащая истощению, включает приблизительно от  $1 \times 10^9$  до  $1 \times 10^{10}$  CD25+ Т-клеток и любое целое число между ними. В одном варианте осуществления полученная популяция с истощением регуляторных Т-клеток имеет  $2 \times 10^9$  регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток, или менее (например,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^7$  или менее CD25+ клеток).

В одном варианте осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ клетки, удаляют из популяции с использованием системы CliniMAC с набором трубок для истощения, например, таких как трубки 162-01. В одном варианте осуществления систему CliniMAC используют с настройками для истощения, например, такими как DEPLETION2.1.

Без связи с конкретной теорией, снижение уровня отрицательных регуляторов иммунных клеток (например, снижение количества нежелательных иммунных клеток, например, клеток T<sub>REG</sub>) у индивидуума перед аферезом или в процессе изготовления продукта с CAR-экспрессирующими клетками, может снизить риск рецидива у индивидуума. В одном варианте осуществления пациента предварительно лечат одним или несколькими способами терапии, которые снижают уровень T<sub>REG</sub>, перед сбором клеток для производства продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), тем самым снижая риск рецидива у пациента при лечении CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, при лечении CTL019). Способы уменьшения количества клеток T<sub>REG</sub> включают, но не ограничиваются ими, циклофосфамид, антитело против GITR (антитело против GITR, описанное в настоящем описании), истощение CD25 и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления способы получения включают уменьшение количества (например, истощение) клеток T<sub>REG</sub> перед получением CAR-экспрессирующих клеток. Например, способы получения включают приведение в контакт образца, например, образца для афереза, с антителом против GITR и/или антителом против CD25

(или его фрагментом или CD25-связывающим лигандом), например, для истощения клеток T<sub>REG</sub> перед изготовлением продукта с CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетки, НК-клетки).

5 В одном варианте осуществления пациента предварительно лечат циклофосфамидом перед сбором клеток для производства продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), тем самым снижая риск рецидива у пациента при лечении CAR-экспрессирующими клетками (например, при лечении CTL019). В одном варианте осуществления пациента предварительно лечат антителом против GITR перед сбором клеток для производства продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), тем самым снижая риск рецидива у пациента при лечении CAR-экспрессирующими клетками (например, при лечении CTL019).

10 В одном варианте осуществления процесс производства CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) модифицируют для истощения клеток T<sub>REG</sub> перед производством продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, продукта CTL019). В одном варианте осуществления истощение CD25 используют для истощения клеток T<sub>REG</sub> перед производством продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, продукта CTL019).

15 Способы, описанные в настоящем описании, могут включать более одной стадии селекции, например, более одной стадии истощения. Увеличение в количестве популяции Т-клеток посредством отрицательной селекции можно проводить, например, с использованием комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для клеток, подвергнутых отрицательной селекции. Одним способом является сортировка и/или селекция клеток посредством негативной магнитной 20 иммунной адгезии или проточной цитометрии, в которых используется смесь моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на клетках, подвергаемых отрицательной селекции. Например, для увеличения в количестве CD4+ клеток посредством отрицательной селекции смесь моноклональных антител может включать антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8.

25 Способы, описанные в настоящем описании, кроме того, могут включать удаление клеток из популяции, которые экспрессируют опухолевый антиген, например, опухолевый антиген, который не содержит CD25, например, CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 или CD11b, тем самым, получая популяцию с истощенными регуляторными Т-клетками, например, истощенными по CD25+ клетками, и истощенными по 30 опухолевому антигену клетками, которая пригодна для экспрессии CAR, например, CAR, описанного в настоящем описании. В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками, например, CD25+ клетками. Например, антитело против CD25 или его фрагмент и антитело против опухолевого антигена, или его фрагмент, можно связывать с одной и той же подложкой, например, гранулами, которые можно использовать для удаления клеток, или антитело против CD25 или его фрагмент, или антитело против опухолевого антигена или его фрагмент, можно связывать с отдельными гранулами, смесь которых можно использовать для удаления клеток. В других вариантах 35 осуществления удаление Т-регуляторных клеток, например, CD25+ клеток, и удаление клеток, экспрессирующих опухолевый антиген, является последовательным и может происходить, например, в любом порядке.

45 Также предусматриваются способы, которые включают устранение из популяции

клеток, которые экспрессируют ингибитор точки контроля, например, ингибитор точки контроля, описанный в настоящем описании, например, одного или нескольких типов из PD1+ клеток, LAG3+ клеток и TIM3+ клеток, тем самым, обеспечивая популяцию с истощенными регуляторными Т-клетками, например, с истощенными CD25+ клетками, и клетками, истощенными по ингибитору точки контроля, например, истощенными PD1+, LAG3+ и/или TIM3+ клетками. Иллюстративные ингибиторы точки контроля включают B7-H1, B7-1, CD160, P1H, 2B4, PD1, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, TIGIT, CTLA-4, BTLA и LAIR1. В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие ингибитор точки контроля, удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками, например, CD25+ клетками. Например, антитело против CD25 или его фрагмент и антитело против ингибитора точки контроля или его фрагмент можно связывать с одними и теми же гранулами, которые можно использовать для удаления клеток, или антитело против CD25 или его фрагмент, или антитело против ингибитора точки контроля или его фрагмент, можно связывать с отдельными гранулами, смесь которых можно использовать для удаления клеток. В других вариантах осуществления удаление Т-регуляторных клеток, например, CD25+ клеток, и удаление клеток, экспрессирующих ингибитор точки контроля, является последовательным и может происходить, например, в любом порядке.

Способы, описанные в настоящем описании, могут включать стадию положительной селекции. Например, Т-клетки можно выделять посредством инкубации с гранулами, конъюгированными с антителом против CD3/против CD28 (например, 3×28), такими как DYNABEAD® M-450 CD3/CD28 Т, в течение периода времени, достаточного для положительной селекции желаемых Т-клеток. В одном варианте осуществления период времени составляет приблизительно 30 минут. В следующем варианте осуществления период времени находится в диапазоне от 30 минут до 36 часов или более, включая все целые числа между ними. В следующем варианте осуществления, период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В другом предпочтительном варианте осуществления период времени составляет от 10 до 24 часов, например, 24 часа. Более длительное время инкубации можно использовать для выделения Т-клеток в любой ситуации, где Т-клеток мало по сравнению с другими типами клеток, как например, в случае выделения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) из ткани опухоли или от индивидуумов с иммунодефицитом. Кроме того, использование более длительного времени инкубации может повышать эффективность улавливания CD8+ Т-клеток. Таким образом, посредством простого укорочения или удлинения времени Т-клеткам позволяют связываться с гранулами CD3/CD28 и/или путем увеличения или снижения соотношения гранул и Т-клеток (как дополнительно описано в настоящем описании), можно предпочтительно проводить селекцию в отношении или против субпопуляции Т-клеток при инициации культуры или в другие моменты времени процесса. Кроме того, путем увеличения или снижения соотношения антител против CD3 и/или антител против CD28 на гранулах или другой поверхности, можно предпочтительно проводить селекцию в отношении или против субпопуляции Т-клеток при инициации культуры или в другие желаемые моменты времени.

В одном варианте осуществления можно отбирать популяцию Т-клеток, которая экспрессирует один или несколько из IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-21, CCF20, GM-CSF, IL-10, IL-13, гранзима В и перфорина, или других соответствующих молекул, например, других цитокинов. Способы скрининга клеточной экспрессии можно определять, например, способами, описанными в публикации РСТ № WO 2013/126712. В одном варианте осуществления популяция Т-клеток экспрессирует

цитокин CCF20, IL-17a, IL-6 и их комбинации.

Для выделения желаемой популяции клеток посредством положительной или отрицательной селекции концентрацию клеток и величину поверхности (например, количество частиц, таких как гранулы) можно варьировать. В некоторых аспектах, может быть желательным значительное уменьшение объема, в котором гранулы и клетки смешивают друг с другом (например, увеличение концентрации клеток), для обеспечения максимального контакта клеток и гранул. Например, в одном аспекте используют концентрацию 10 миллиардов клеток/мл, 9 миллиардов клеток/мл, 8 миллиардов клеток/мл, 7 миллиардов клеток/мл, 6 миллиардов клеток/мл или 5 миллиардов клеток/мл. В другом аспекте используют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. В следующем аспекте используют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В следующих аспектах можно использовать концентрации, составляющие 125 или 150 миллионов клеток/мл.

Использование высоких концентраций может приводить к увеличению выхода клеток, активации клеток и экспансии клеток. Кроме того, применение высоких концентраций клеток позволяет более эффективно улавливание клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, таких как CD28-отрицательные Т-клетки, или улавливание из образцов, где присутствует множество опухолевых клеток (например, кровь при лейкозе, опухолевая ткань и т.д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность, и их получение может быть желательным. Например, использование высокой концентрации клеток обеспечивает более эффективную селекцию CD8+ Т-клеток, которые обычно имеют более слабую экспрессию CD28.

В сходном аспекте может быть желательным снижение концентрации клеток. Путем значительного разбавления смеси Т-клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы), взаимодействия между частицами и клетками минимизируют. Это приводит к селекции клеток, которые экспрессируют высокие количества желаемых антигенов, подлежащих связыванию с частицами. Например, CD4+ Т-клетки экспрессируют более высокие уровни CD28 и более эффективно улавливаются, чем CD8+ Т-клетки, в разбавленных концентрациях. В одном аспекте концентрация используемых клеток составляет  $5 \times 10^6$ /мл. В других аспектах используемая концентрация может составлять приблизительно от  $1 \times 10^5$ /мл до  $1 \times 10^6$ /мл, включая любое целое число между ними.

В других аспектах клетки можно инкубировать на вращающемся устройстве в течение разных периодов времени при различных скоростях либо при 2-10°C, либо при комнатной температуре.

Т-клетки, предназначенные для стимуляции, также можно замораживать после стадии промывания. Без связи с теорией полагают, что замораживание и последующее оттаивание обеспечивает более однородный продукт вследствие устранения гранулоцитов и в некоторой степени моноцитов из популяции клеток. После стадии промывания, которая устраняет плазму и тромбоциты, клетки можно суспендировать в растворе для замораживания. Хотя множество растворов и параметров для замораживания известно в данной области и пригодно в этом контексте, один способ вовлекает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточный альбумин человека, или культуральной среды, содержащей 10% декстран 40 и 5% декстрозу, 20% сывороточный альбумин человека и 7,5% DMSO, или 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% декстрозу 5%, 0,45% NaCl, 10% декстран 40 и 5% декстрозу, 20% сывороточный альбумин человека, и 7,5% DMSO или другие подходящие среды для замораживания клеток,

содержащие, например, Hespan и PlasmaLyte A, затем клетки замораживают до  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1^{\circ}$  в минуту и хранят в парообразной фазе в емкости для хранения в жидком азоте. Можно использовать другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемое замораживание сразу до  $-20^{\circ}\text{C}$  или в жидком азоте.

5 В некоторых аспектах криосохраненные клетки размораживают и промывают, как описано в настоящем описании, и им позволяют покоиться в течение одного часа при комнатной температуре перед активацией с использованием способов по настоящему изобретению.

10 Также в контексте изобретения предусматривается получение образцов крови или продукта афереза от индивидуума в период времени до того, как клетки, описанные в настоящем описании, могут потребоваться. По существу, источник клеток, подлежащих увеличению в количестве, можно собирать в любой требуемый момент времени и желаемые клетки, такие как Т-клетки, можно выделять и замораживать для последующего применения в терапии иммунными эффекторными клетками любого 15 множества заболеваний и состояний, при которых является полезной терапия иммунными эффекторными клетками, таких как заболевания и состояния, описанные в настоящем описании. В одном аспекте получение образца крови или продукта афереза проводят от в основном здорового индивидуума. В некоторых аспектах получение образца крови или продукта афереза проводят от в основном здорового индивидуума, 20 который имеет риск развития заболевания, но у которого заболевание еще не развилось, и представляющие интерес клетки выделяют и замораживают для последующего применения. В некоторых аспектах Т-клетки можно увеличивать в количестве, замораживать и использовать позднее. В некоторых аспектах взятие образцов проводят сразу после постановки диагноза конкретного заболевания, как описано в настоящем 25 описании, но перед каким-либо из способов лечения. В следующем аспекте клетки выделяют из образца крови или продукта афереза от индивидуума перед любым из множества соответствующих способов лечения, включая, но не ограничиваясь ими, лечение средствами, такими как натализумаб, эфализумаб, противовирусные средства, химиотерапия, лучевая терапия, иммунодепрессивные средства, такие как циклоспорин, 30 азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антитела или другие иммунодепрессивные средства, такие как CAMPATH, антитела против CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228 и лучевая терапия.

В следующем аспекте настоящего изобретения Т-клетки получают от пациента 35 непосредственно после лечения, которое сохраняет у индивидуума функциональные Т-клетки. В этом отношении было обнаружено, что в случае определенных способов лечения злокачественной опухоли, в частности, лечения лекарственными средствами, которые повреждают иммунную систему, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты в норме восстанавливаются после лечения, качество полученных Т- 40 клеток может быть оптимальным или улучшенным в отношении их способности увеличиваться в количестве *ex vivo*. Аналогично, после манипулирования *ex vivo* с использованием способов, описанных в настоящем описании, эти клетки могут быть в предпочтительном состоянии для повышения приживаемости и экспансии *in vivo*. Таким образом, в контексте изобретения предусматривается сбор клеток крови, в том 45 числе Т-клеток, дендритных клеток или других клеток гемопоэтического ростка в ходе этой стадии восстановления. Кроме того, в некоторых аспектах, можно использовать режимы мобилизации (например, мобилизация посредством GM-CSF) и кондиционирования у индивидуума, которые способствуют репопуляции, рециркуляции,

регенерации и/или экспансии конкретных типов клеток, особенно в течение определенного периода времени после терапии. Иллюстративные типы клеток включают Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

В одном варианте осуществления иммунные эффекторный клетки, экспрессирующие молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании, получают от индивидуума, которому вводили низкую усиливающую иммунитет дозу ингибитора mTOR. В одном варианте осуществления популяцию иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, подлежащих модификации способами инженерии для экспрессии CAR, собирают после достаточного периода времени или после достаточного дозирования низкой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR, так что уровень отрицательных по PD1 иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, или соотношение отрицательные по PD-1 иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки/положительные по PD-1 иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, у индивидуума или после взятия у индивидуума по меньшей мере временно увеличивается.

В других вариантах осуществления популяцию иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, которые модифицированы или будут модифицированы способами инженерии для экспрессии CAR, можно обрабатывать *ex vivo* путем приведения в контакт с количеством ингибитора mTOR, которое увеличивает количество отрицательных по PD1 иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, или увеличивает соотношение отрицательные по PD-1 иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки/положительные по PD-1 иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки.

В одном варианте осуществления популяция Т-клеток является дефицитной по диаглицеринкиназе (DGK). Клетки с дефицитом DGK включают клетки, которые не экспрессируют РНК или белок DGK, или имеет сниженную или ингибированную активность DGK. Клетки с дефицитом DGK можно получать посредством генетических подходов, например, введения агентов РНК-интерференции, например, миРНК, кшРНК, микроРНК, для снижения или предотвращения экспрессии DGK. Альтернативно клетки с дефицитом DGK можно получать путем обработки ингибиторами DGK, описанными в настоящем описании.

В одном варианте осуществления популяция Т-клеток имеет дефицит Ikaros. Клетки с дефицитом Ikaros включают клетки, которые не экспрессируют РНК или белок Ikaros, или обладают сниженной или ингибированной активностью Ikaros. Клетки с дефицитом Ikaros можно получать с использованием генетических подходов, например, введения агентов РНК-интерференции, например, миРНК, кшРНК, микроРНК, для снижения или предотвращения экспрессии Ikaros. Альтернативно клетки с дефицитом Ikaros можно получать путем обработки ингибиторами Ikaros, например, леналидомидом.

В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток является дефицитной по DGK и дефицитной по Ikaros, например, не экспрессирует DGK и Ikaros, или имеет сниженную или ингибированную активность DGK и Ikaros. Такие клетки с дефицитом DGK и Ikaros можно получать любыми способами, описанными в настоящем описании.

#### **Аллогенный CAR**

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, иммунная эффекторная клетка может представлять собой аллогенную эффекторную клетку, например Т-клетку. Например, клетка может представлять собой аллогенную Т-клетку, например аллогенную Т-клетку, лишенную экспрессии функционального Т-клеточного рецептора (TCR) и/или лейкоцитарного антигена человека (HLA), например, HLA класса

I и/или HLA класса II.

Например, Т-клетку, лишенную функционального TCR, можно конструировать так, чтобы она не экспрессировала какой-либо функциональный TCR на ее поверхности, можно конструировать так, что она не экспрессировала одной или нескольких субъединиц, которые содержит функциональный TCR (например, можно конструировать так, чтобы она не экспрессировала (или демонстрировала сниженную экспрессию) TCR-альфа, TCR-бета, TCR-гамма, TCR-дельта, TCR-эпсилон и/или TCR-зета), или конструировать так, чтобы она продуцировала очень мало функционального TCR на ее поверхности. Альтернативно Т-клетка может экспрессировать по существу нарушенный TCR, например, посредством экспрессии мутантных или укороченных форм одной или нескольких субъединиц TCR. Термин "по существу нарушенный TCR" означает, что этот TCR не индуцирует неблагоприятную иммунную реакцию у хозяина.

Т-клетку, описанную в настоящем описании, можно конструировать, например, чтобы она не экспрессировала функциональный HLA на ее поверхности. Например, Т-клетку, описанную в настоящем описании, можно модифицировать способами инженерии так, чтобы на клеточной поверхности подавлялась экспрессия HLA, например, HLA класса I и/или HLA класса II. В некоторых вариантах осуществления подавление HLA можно осуществлять путем снижения или устранения экспрессии микроглобулина бета-2 (B2M).

В некоторых вариантах осуществления Т-клетка может быть лишена функционального TCR и функционального HLA, например, HLA класса I и/или HLA класса II.

Модифицированные Т-клетки, которые лишены экспрессии функционального TCR и/или HLA, можно получать любыми подходящими способами, включая нокаут или нокдаун одной или нескольких субъединиц TCR или HLA. Например, Т-клетка может включать нокдаун TCR и/или HLA с использованием миРНК, кшРНК, коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных кластерами (CRISPR), нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), или эндонуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN).

В некоторых вариантах осуществления аллогенная клетка может представлять собой клетку, которая не экспрессирует или экспрессирует на низких уровнях ингибиторную молекулу, например, посредством любого способа, описанного в настоящем описании. Например, клетка может представлять собой клетку, которая не экспрессирует или экспрессирует на низких уровнях ингибиторную молекулу, например, которая может снижать способность экспрессирующей CAR клетки индуцировать иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибиторных молекул включают PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAF9, аденозин и TGFR (например, TGFR-бета). Ингибирование ингибиторной молекулы, например, посредством ингибирования на уровне ДНК, РНК или белка, может оптимизировать эффективность экспрессирующей CAR клетки. В некоторых вариантах осуществления можно использовать ингибиторную нуклеиновую кислоту, например дцРНК, например, миРНК или кшРНК, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные кластерами (CRISPR), нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN) или эндонуклеазу с цинковыми пальцами (ZFN), например, как описано в настоящем описании.

*миРНК и кшРНК для ингибирования TCR или HLA*



В некоторых вариантах осуществления экспрессию TCR и/или экспрессию HLA можно ингибировать с использованием миРНК или кшРНК, которая нацелена на нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR и/или HLA, и/или ингибиторную молекулу, описанную в настоящем описании (например, PD1, PD-F1, PD-F2, CTFA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTFA, TIGIT, FAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, МНС класса I, МНС класса II, GAF9, аденозин и TGFR-бета), в клетке, например, Т-клетке.

Экспрессирующие системы для миРНК и кшРНК и иллюстративные кшРНК описаны, например, в абзацах 649 и 650 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

#### *CRISPR для ингибирования TCR или HLA*

"CRISPR" или "CRISPR против TCR и/или HLA" или "CRISPR для ингибирования TCR и/или HLA", как используют в рамках изобретения, относится к набору коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных кластерами, или к системе, содержащей такой набор повторов. "Cas", как используют в рамках изобретения, относится к ассоциированному с CRISPR белку. Система "CRISPR/Cas" относится к системе, происходящей из CRISPR и Cas, которую можно использовать для сайленсинга или мутации генов TCR и/или HLA, и/или ингибиторной молекулы, описанной в настоящем описании (например, PD1, PD-F1, PD-F2, CTFA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, МНС класса I, МНС класса II, GAL9, аденозин и TGFR-бета), в клетке, например, Т-клетке.

Система CRISPR/Cas и ее применение описаны, например, в абзацах 651-658 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

#### *TALEN для ингибирования TCR и/или HLA*

"TALEN" или "TALEN против HLA и/или TCR" или "TALEN для ингибирования HLA и/или TCR" относится к эффекторной нуклеазе, подобной активатору транскрипции, которая представляет собой искусственную нуклеазу, которую можно использовать для редактирования гена HLA и/или TCR и/или ингибиторной молекулы, описанной в настоящем описании (например, PD1, PD-F1, PD-F2, CTFA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, МНС класса I, МНС класса II, GAL9, аденозин и TGFR-бета), в клетке, например, Т-клетке.

TALEN и их применение описаны, например, в абзацах 659-665 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

#### *Нуклеаза с цинковыми пальцами для ингибирования HLA и/или TCR*

"ZFN" или "нуклеаза с цинковыми пальцами" или "ZFN против HLA и/или TCR" или "ZFN для ингибирования HLA и/или TCR" относятся к нуклеазе с цинковыми пальцами, которая представляет собой искусственную нуклеазу, которую можно использовать для редактирования гена HLA и/или TCR и/или ингибиторной молекулы, описанной в настоящем описании (например, PD1, PD-F1, PD-F2, CTFA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160,

2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAL9, аденозин и TGFR-бета), в клетке, например, Т-клетке.

ZFN и их применение описаны, например, в абзацах 666-671 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

#### *Экспрессия теломеразы*

Без связи с какой-либо конкретной теорией, в некоторых вариантах осуществления терапевтическая Т-клетка имеет кратковременную персистенцию у пациента вследствие укороченных теломер в Т-клетке; таким образом, трансфекция гена теломеразы может удлинить теломеры Т-клеток и повысить персистенцию Т-клеток у пациента. См. Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", Journal of Clinical Investigation, 117: 1466-1476 (2007). Таким образом, в одном варианте осуществления иммунная эффекторная клетка, например Т-клетка, эктопически экспрессирует субъединицу теломеразы, например, каталитическую субъединицу теломеразы, например TERT, например, hTERT. В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу получения CAR-экспрессирующей клетки, включающему приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей субъединицу теломеразы, например, каталитическую субъединицу теломеразы, например TERT, например hTERT. Клетку можно приводить в контакт с нуклеиновой кислотой до, одновременно или после приведения в контакт с конструкцией, кодирующей CAR.

В одном аспекте изобретение относится к способу получения популяции иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток). В одном варианте осуществления способ включает: предоставление популяции иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или НК-клеток), приведение популяции иммунных эффекторных клеток в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR; и приведение в контакт популяции иммунных эффекторных клеток с нуклеиновой кислотой, кодирующей субъединицу теломеразы, например hTERT, в условиях, которые позволяют экспрессию CAR и теломеразы.

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая субъединицу теломеразы, представляет собой ДНК. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая субъединицу теломеразы, содержит промотор, способный запускать экспрессию субъединицы теломеразы.

В одном варианте осуществления hTERT имеет аминокислотную последовательность белка с ID GenBank AAC51724.1 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795), как указано в SEQ ID NO: 82 настоящего описания.

В одном варианте осуществления hTERT имеет последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 82. В одном варианте осуществления hTERT имеет последовательность SEQ ID NO: 82. В одном варианте осуществления hTERT содержит делецию (например, не более чем 5, 10, 15, 20 или 30 аминокислот) на N-конце, на C-конце или на обоих из них. В одном варианте осуществления hTERT содержит трансгенную аминокислотную последовательность (например, не более чем 5, 10, 15, 20 или 30 аминокислот) на N-конце, C-конце или обоих из них.

В одном варианте осуществления hTERT кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты с номером доступа GenBank № AF018167 (Meyerson et al., "hEST2,

the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Lip-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795), как указано в SEQ ID NO: 83 настоящего описания.

В одном варианте осуществления hTERT кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 83. В одном варианте осуществления hTERT кодируется нуклеиновой кислотой SEQ ID NO: 83.

#### **Активация и увеличение в количестве иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток)**

Иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, можно активировать и увеличивать в количестве, в основном с использованием способов, описанных, например, в патентах США 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041 и публикации патентной заявки США № 20060121005. В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки подвергаются анализу, как описано в настоящем описании (например, анализируют один или несколько биомаркеров) до, в процессе или после активации или до, в процессе или после увеличения в количестве.

Как правило, популяцию иммунных эффекторных клеток, можно увеличивать в количестве путем контакта с поверхностью, имеющей связанное с ней средство, которое стимулирует сигнал, ассоциированный с комплексом CD3/TCR, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток можно стимулировать, как описано в настоящем описании, например, путем контакта с антителом против CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом против CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем контакта с активатором протеинкиназы С (например, бриостатин) совместно с ионофором кальция. Для стимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток можно использовать лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом против CD3 и антителом против CD28 в условиях, пригодных для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации либо CD4+ Т-клеток, либо CD8+ Т-клеток, можно использовать антитело против CD3 и антитело против CD28. Примеры антител против CD28 включают 9.3, В-Т3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, Франция), которые можно использовать, а также можно использовать и другие способы, широко известные в данной области (Berg *et al.*, Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Naanen *et al.*, J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland *et al.*, J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

В определенных аспектах первичный стимулирующий сигнал и костимулирующий сигнал для Т-клеток может быть предоставлен посредством различных протоколов. Например, средства, обеспечивающие каждый сигнал, могут быть в растворе или могут быть связанными с поверхностью. Когда они связаны с поверхностью, средства могут быть связаны с одной и той же поверхностью (т.е. в "цис"-форме) или с различными поверхностями (т.е. в "транс"-форме). Альтернативно одно средство может быть связано с поверхностью, а другое средство может находиться в растворе. В одном аспекте средство, обеспечивающее костимулирующий сигнал, связано с клеточной поверхностью, и средство, обеспечивающее первичный активирующий сигнал, находится в растворе или связано с поверхностью. В некоторых аспектах оба средства могут находиться в растворе. В одном аспекте средства могут быть в растворимой форме, а затем могут быть сшиты с поверхностью, такой как клетка, экспрессирующая Fc-рецепторы или антитело или другое связывающее соединение, которое будет связываться со средствами.

В этом отношении, см., например, публикации патентных заявок США № 20040101519 и 20060034810 для искусственных антигенпредставляющих клеток (аАРС), которые предусматриваются для применения для активации и увеличения в количестве Т-клеток в рамках настоящего изобретения.

5 В одном аспекте два средства иммобилизованы на гранулах, либо на одних и тех же гранулах, т.е. "цис", либо на различных гранулах, т.е. "транс". В качестве примера, средство, обеспечивающее первичный сигнал активации, представляет собой антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент и средство, обеспечивающее костимулирующий сигнал, представляет собой антитело против CD28 или его  
10 антигенсвязывающий фрагмент; и оба средства совместно иммобилизованы на одних и тех же гранулах в эквивалентных молекулярных количествах. В одном аспекте используют соотношение 1:1 для каждого антитела, связанного с гранулами, для увеличения в количестве CD4+ Т-клеток и роста Т-клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения используют такое соотношение антител против CD3:CD28,  
15 связанных с гранулами, при котором происходит увеличение экспансии Т-клеток по сравнению с экспансией, наблюдаемой с использованием соотношения 1:1. В одном конкретном аспекте наблюдается увеличение в от приблизительно 1 до приблизительно 3 раз по сравнению с экспансией, наблюдаемой с использованием соотношения 1:1. В одном аспекте соотношение антител против CD3:CD28, связанных с гранулами,  
20 находится в диапазоне от 100:1 до 1:100, включая все целые числа между ними. В одном аспекте с частицами связано больше антитела против CD28, чем антитела против CD3, т.е. соотношение CD3:CD28 меньше единицы. В определенных аспектах соотношение антитела против CD28 и антитела против CD3, связанного с гранулами, превышает 2:1. В одном конкретном аспекте используют соотношение антител против CD3:CD28,  
25 связанных с гранулами, равное 1:100. В одном аспекте используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с гранулами, равное 1:75. В следующем аспекте используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с гранулами, равное 1:50. В одном аспекте используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с гранулами, равное 1:30. В одном предпочтительном аспекте используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с гранулами, равное 1:10. В одном аспекте используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с гранулами, равное 1:3. В следующем аспекте используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с гранулами, равное 3:1.

Для стимуляции Т-клеток и других клеток-мишеней можно использовать отношения  
35 частиц к клеткам от 1:500 до 500:1, включая любые целые числа между ними. Как будет хорошо понятно специалистам в данной области, отношение частиц к клеткам может зависеть от размера частиц относительно клетки-мишени. Например, гранулы малых размеров могут связать только несколько клеток, в то время как гранулы больших размеров могут связывать множество клеток. В некоторых аспектах для стимуляции  
40 Т-клеток можно использовать соотношение клеток и частиц, которое находится в диапазоне от 1:100 до 100:1, включая любые целые числа между ними, и в следующих аспектах соотношение включает от 1:9 до 9:1, включая любые целые числа между ними. Соотношение частиц с антителом против CD3 и антителом против CD28 и Т-клеток, которое приводит к стимуляции Т-клеток, может варьироваться, как отмечалось выше,  
45 однако определенные пригодные величины включают 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 и 15:1, причем одно пригодное соотношение частиц на Т-клетку составляет по меньшей мере 1:1. В одном аспекте используют соотношение частиц и клеток 1:1 или менее. В одном

конкретном аспекте пригодное соотношение частица:клетка равно 1:5. В следующих аспектах соотношение частиц и клеток может варьироваться в зависимости от дня стимуляции. Например, в одном аспекте соотношение частиц и клеток составляет от 1:1 до 10:1 на первые сутки, и дополнительные частицы добавляют к клеткам каждые 5 ступки или раз в двое суток после этого в течение вплоть до 10 суток, в конечных соотношениях от 1:1 до 1:10 (исходя из количества клеток в день добавления). В одном конкретном аспекте соотношение частиц и клеток составляет 1:1 в первый день стимуляции и его доводят до 1:5 на третьи и пятые сутки стимуляции. В одном аспекте частицы добавляют раз в сутки или раз в двое суток до конечного соотношения 1:1 на 10 первые сутки и 1:5 на третьи и пятые сутки стимуляции. В одном аспекте соотношение частиц и клеток составляет 2:1 на первые сутки стимуляции и его доводят до 1:10 на третьи и пятые сутки стимуляции. В одном аспекте частицы добавляют раз в ступки или раз в двое суток до конечного соотношения 1:1 на первые сутки, и 1:10 на третьи и пятые сутки стимуляции. Специалисту в данной области будет понятно, что множество 15 других соотношений может быть пригодным для применения в рамках настоящего изобретения. В частности, соотношения будут варьироваться в зависимости от размера частиц и от размера и типа клеток. В одном аспекте наиболее типичные соотношения для применения составляют около 1:1, 2:1 и 3:1 на первые сутки.

В следующих аспектах клетки, такие как Т-клетки, комбинируют с покрытыми 20 средством гранулами, затем гранулы и клетки разделяют, а затем клетки культивируют. В альтернативном аспекте перед культивированием покрытые средством гранулы и клетки не отделяют, а культивируют вместе. В следующем аспекте гранулы и клетки сначала концентрируют с использованием силы, такой как магнитная сила, что приводит к увеличенному лигированию маркеров клеточной поверхности, тем самым индуцируя 25 стимуляцию клеток.

В качестве примера, белки клеточной поверхности можно лигировать, позволяя парамагнитным гранулам, с которыми связаны антитела против CD3 и антитела против CD28 (гранулы 3 × 28) контактировать с Т-клетками. В одном аспекте клетки (например, 30 от  $10^4$  до  $10^9$  Т-клеток) и гранулы (например, парамагнитные гранулы DYNABEAD® M-450 CD3/CD28 Т в соотношении 1:1) комбинируют в буфере, например PBS (без двухвалентных катионов, таких как кальций и магний). Вновь, специалисту в данной области будет хорошо понятно, что можно использовать любую концентрацию клеток. Например, клетки-мишени могут быть очень редкими в образце и могут составлять 35 только 0,01% образца, или весь образец (т.е. 100%) может состоять из представляющих интерес клеток-мишеней. Таким образом, в контексте настоящего изобретения предусматривается любое количество клеток. В некоторых аспектах может быть желательным значительное уменьшение объема, в котором частицы и клетки смешивают друг с другом (т.е. увеличение концентрации клеток) для обеспечения максимального 40 контакта клеток и частиц. Например, в одном аспекте используют концентрацию приблизительно 10 миллиардов клеток/мл, 9 миллиардов клеток/мл, 8 миллиардов клеток/мл, 7 миллиардов клеток/мл, 6 миллиардов клеток/мл, 5 миллиардов клеток/мл или 2 миллиарда клеток/мл. В одном аспекте используют более 100 миллионов клеток/мл. В следующем аспекте используют концентрацию клеток, составляющую 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В другом аспекте используют 45 концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В следующих аспектах можно использовать концентрации 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к увеличению выхода клеток, активации клеток и экспансии клеток. Кроме того, применение высоких концентраций

клеток позволяет более эффективное улавливание клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, таких как отрицательные по CD28 Т-клетки. Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность, и в некоторых аспектах может быть желательным их получение. Например, использование

5 высокой концентрации клеток позволяет более эффективную селекцию CD8+ Т-клеток, которые обычно имеют более слабую экспрессию CD28.

В одном варианте осуществления клетки, трансдуцированные нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, например, CAR, описанный в настоящем описании, увеличивают в количестве, например, способом, описанным в настоящем описании. В одном варианте

10 осуществления клетки увеличивают в количестве в культуре в течение периода, составляющего от нескольких часов (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 час) до приблизительно 14 суток (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 суток). В одном варианте осуществления клетки увеличивают в количестве в течение периода от 4 до 9 суток. В одном варианте осуществления клетки увеличивают

15 в количестве в течение периода 8 суток или менее, например, 7, 6 или 5 суток. В одном варианте осуществления клетки, например, клетки с CAR против CD19, описанные в настоящем описании, увеличивают в количестве в культуре в течение 5 суток, и полученные клетки являются более эффективными, чем те же клетки, которые увеличивали в количестве в культуре в течение 9 суток в тех же условиях

20 культивирования. Эффективность может определяться, например, различными функциями Т-клеток, например, пролиферацией, уничтожением клеток-мишеней, продукцией цитокинов, активацией, миграцией и их комбинациями. В одном варианте осуществления клетки, например, клетки с CAR против CD19, описанные в настоящем описании, которые увеличивали в количестве в течение 5 суток, демонстрируют

25 увеличение удвоений клеток по меньшей мере в один, два, три или четыре раза при стимуляции антигеном по сравнению с теми же клетками, которые увеличивали в количестве в течение 9 суток в тех же условиях культивирования. В одном варианте осуществления клетки, например, клетки, экспрессирующие CAR против CD19, описанные в настоящем описании, увеличивают в количестве в культуре в течение 5

30 суток, и полученные клетки проявляют более высокую продукцию провоспалительных цитокинов, например, уровни IFN- $\gamma$  и/или GM-CSF, по сравнению с теми же клетками, которые увеличивали в количестве в культуре в течение 9 суток в тех же условиях культивирования. В одном варианте осуществления клетки, например, клетки с CAR против CD19, описанные в настоящем описании, которые увеличивали в количестве в

35 течение 5 суток, демонстрируют увеличение продукции провоспалительных цитокинов в пг/мл, например, уровни IFN- $\gamma$  и/или GM-CSF, по меньшей мере в один, два, три, четыре, пять, десять раз или более по сравнению с теми же клетками, которые увеличивали в количестве в культуре в течение 9 суток в тех же условиях культивирования.

40 Также может быть желательным несколько циклов стимуляции, так чтобы время культивирования Т-клеток составляло 60 суток или более. Условия, пригодные для культивирования Т-клеток, включают соответствующие среды (например, минимальная поддерживающая среда или среда RPMI 1640 или, X-vivo 15, (Lonza)), которые могут содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая

45 сыворотку (например, эмбриональная сыворотка человека или сыворотка человека), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF $\beta$  и TNF- $\alpha$  или любые другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области. Другие добавки для роста клеток включают, но не ограничиваются ими,

поверхностно-активное вещество, плазманат и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среды могут включать RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, Optimizer, с добавлением аминокислот, пирувата натрия и витаминов, либо бессывороточные, либо дополненные  
5 соответствующем количеством сыворотки (или плазмы) или определенным набором гормонов, и/или количеством цитокина(ов), достаточным для роста и экспансии Т-клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры, но не в культуры клеток, которые подлежат инфузии индивидууму. Клетки-мишени поддерживают в условиях, необходимых для поддержания  
10 роста, например, при соответствующей температуре (например, 37°C) и в соответствующей атмосфере (например, воздух плюс 5% CO<sub>2</sub>).

В одном варианте осуществления клетки увеличивают в количестве в подходящей среде (например, среды, описанные в настоящем описании), которая включает один или несколько интерлейкинов, которые приводят к увеличению количества клеток по  
15 меньшей мере в 200 раз (например, в 200 раз, в 250 раз, в 300 раз, в 350 раз) в период экспансии в течение 14 суток, например, при измерении способом, описанным в настоящем описании, таким как проточная цитометрия. В одном варианте осуществления клетки увеличивают в количестве в присутствии IL-15 и/или IL-7 (например, IL-15 и IL-7).

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем описании, например, способы получения CAR-экспрессирующих клеток, включают удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25+ Т-клеток, из популяции, например, с  
использованием антитела против CD25 или его фрагмента, или CD25-связывающего лиганда, IL-2. Способы удаления регуляторных Т-клеток, например, CD25+ Т-клеток,  
25 из популяции клеток описаны в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способы, например, способы получения, кроме того, включают приведение в контакт популяции клеток (например, популяции клеток с истощением регуляторных Т-клеток, таких как CD25+ Т-клетки; или популяции клеток, которую ранее приводили в контакт с антителом против CD25, его фрагментом, или CD25-  
30 связывающим лигандом) с IL-15 и/или IL-7. Например, популяцию клеток (например, которую ранее приводили в контакт с антителом против CD25, его фрагментом или CD25-связывающим лигандом) увеличивают в количестве в присутствии IL-15 и/или IL-7.

В некоторых вариантах осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную  
35 в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей полипептид интерлейкина-15 (IL-15), полипептид альфа-рецептора интерлейкина-15 (IL-15Ra) или комбинацию как полипептида IL-15, так и полипептида IL-15Ra, например, hetIL-15, в процессе получения CAR-экспрессирующей клетки, например, *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей полипептид IL-15, в процессе  
40 получения CAR-экспрессирующей клетки, например, *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей комбинацию как полипептида IL-15, так и полипептида IL-15Ra, в процессе получения CAR-экспрессирующей клетки, например, *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей hetIL-15, в процессе получения CAR-экспрессирующей клетки, например, *ex vivo*.

В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей hetIL-15, в процессе увеличения в количестве *ex vivo*. В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей полипептид IL-15, в процессе увеличения в количестве *ex vivo*. В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей как полипептид IL-15, так и полипептид IL-15Ra, в процессе увеличения в количестве *ex vivo*. В одном варианте осуществления приведение в контакт приводит к выживанию и пролиферации субпопуляции лимфоцитов, например, CD8+ Т-клеток.

В одном варианте осуществления клетки культивируют (например, увеличивают в количестве, стимулируют и/или трансдуцируют) в среде, содержащей сыворотку. Сыворотка может представлять собой, например, сыворотку АВ человека (hAB). В некоторых вариантах осуществления сыворотка hAB присутствует в количестве приблизительно 2%, приблизительно 5%, приблизительно 2-3%, приблизительно 3-4%, приблизительно 4-5% или приблизительно 2-5%. Как показано в примере 15 настоящего изобретения, 2% и 5% сыворотки являются пригодными уровнями, которые позволяют многократное увеличение в количестве Т-клеток. Более того, как показано в Smith et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" *Clinical & Translational Immunology* (2015) 4, e31; doi: 10.1038/cti.2014.31, среда, содержащая 2% сыворотку АВ человека, является пригодной для увеличения в количестве Т-клеток *ex vivo*.

Т-клетки, подвергнутые воздействию в течение различной длительности периодов стимуляции, могут проявлять различные характеристики. Например, типичная кровь или мононуклеарные клеточные продукты подвергнутой аферезу периферической крови имеют популяцию хелперных Т-клеток (ТН, CD4+), которая превышает популяцию цитотоксических или супрессорных Т-клеток (ТС, CD8+). Экспансия Т-клеток *ex vivo* посредством стимуляции рецепторов CD3 и CD28 продуцирует популяцию Т-клеток, которая до приблизительно 8-9 суток состоит в основном из ТН-клеток, в то время как после 8-9 суток, популяция Т-клеток содержит значительно более высокую популяцию ТС-клеток. Таким образом, в зависимости от цели лечения, инфузия индивидууму популяции Т-клеток, содержащей в основном ТН-клетки, может быть преимущественной. Аналогично, если антигенспецифическая подгруппа ТС-клеток является выделенной, может быть предпочтительным увеличение в количестве этой подгруппы в большей степени.

Кроме того, в дополнение к маркерам CD4 и CD8, другие фенотипические маркеры значительно варьируются, однако по большей части, являются воспроизводимыми в ходе процесса экспансии клеток. Таким образом, такая воспроизводимость обеспечивает возможность адаптации продукта в виде активированных Т-клеток к конкретным целям.

В некоторых вариантах осуществления клетки, трансдуцированные нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, например, CAR, описанный в настоящем описании, можно выбирать для введения на основе, например, уровней одного или нескольких белков из CCL20, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-10, IL-13, IL-17a, IL-2, IL-21, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, TNF $\alpha$  и/или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления клетки, трансдуцированные нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, например, CAR, описанный в настоящем описании, можно выбирать для введения на основе, например, уровней экспрессии белков CCL20, IL-17a, IL-6 и их комбинаций.



После конструирования CAR, описанного в настоящем описании, различные анализы можно использовать для оценки активности молекулы, такой как, но не ограничиваясь ими, способность к экспансии Т-клеток после стимуляции антигеном, поддержание экспансии Т-клеток в отсутствие рестимуляции и активность против злокачественной опухоли в различных моделях *in vitro* и на животных. Анализы для оценки эффектов CAR против CD19 более подробно описаны ниже.

Анализ с использованием вестерн-блоттинга экспрессии CAR в первичных Т-клетках можно использовать для обнаружения присутствия мономеров и димеров, например, как описано в абзаце 695 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Экспансию CAR<sup>+</sup> Т-клеток *in vitro* после антигенной стимуляции можно измерять проточной цитометрией. Например, смесь CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток стимулируют APC  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 с последующей трансдукцией лентивирусными векторами, экспрессирующими GFP под контролем промоторов, подлежащих анализу. Иллюстративные промоторы включают промоторы гена CMV IE, EF-1 $\alpha$ , убиквитина С или фосфоглицерокиназы (PGK). Флуоресценцию GFP оценивают на 6 сутки культивирования в подгруппах CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток с использованием проточной цитометрии. См., например, Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009).

Альтернативно смесь CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток стимулируют покрытыми  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 магнитными гранулами на 0 сутки и трансдуцируют посредством CAR на 1 сутки с использованием бицистронного лентивирусного вектора, экспрессирующего CAR вместе с eGFP, с использованием рибосомальной последовательности пропуска 2A. После промывания культуры повторно стимулируют либо клетками K562 с ассоциированным со злокачественной опухолью антигеном, как описано в настоящем описании, (K562-ассоциированный со злокачественной опухолью антиген), либо клетками K562 дикого типа (K562 дикого типа), либо клетками K562, экспрессирующими hCD32 и 4-1BBL, в присутствии антитела против CD3 и антитела против CD28 (K562-BBL-3/28). К культурам раз в двое суток добавляют экзогенный IL-2 в количестве 100 МЕ/мл. GFP<sup>+</sup> Т-клетки подсчитывают проточной цитометрией с использованием подсчета на основе гранул. См., например, Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009).

Также можно измерять длительную экспансию CAR<sup>+</sup> Т-клеток в отсутствие рестимуляции. См., например, Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). В кратком изложении измеряют средний объем Т-клеток (фл) на 8 сутки культивирования с использованием устройства для подсчета частиц Coulter Multisizer III, Nexcelom Cellometer Vision или Millipore Scepter, после стимуляции покрытыми  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 магнитными гранулами на 0 сутки и трансдукции указанным CAR на 1 сутки.

Также для измерения активности CAR-экспрессирующей клетки (например, Т-клетки, НК-клетки) можно использовать модели на животных, например, как описано в абзаце 698 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Дозозависимый ответ на лечение CAR можно оценивать, например, как описано в абзаце 699 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Оценка пролиферации клеток и продукции цитокинов описана ранее, например, в абзаце 700 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В другом варианте осуществления эффективность продукта популяции клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, CAR-экспрессирующих клеток), например, продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток), например, клеток STF019) оценивают с использованием панели цитокинов Fuminex® для определения уровней экспрессии цитокинов. Продукт популяции клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, произведенных CAR-экспрессирующих клеток), например, продукт клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, клеток STF019) активируют *in vitro* посредством экспрессирующих CD19 клеток K562 (K562-19), которые имитируют CD19-экспрессирующие В-клетки при CLL. После активации клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) измеряют профили экспрессии цитокинов в клеточных средах сокультуры и эффективность активированных клеток (например, продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19, например, клеток CTL019) сопоставляют с экспрессией различных цитокинов, включая, но не ограничиваясь ими CCL-20/MIP-3a, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IF-10, IF-13, IF-17a, IF-2, IF-21, IF-4, IF-5, IF-6, IF-9, TNF $\alpha$  и/или их комбинации.

В одном варианте осуществления уровни экспрессии цитокинов являются информативными в отношении эффективности популяции клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, в отношении уничтожения опухолевых клеток). В одном варианте осуществления уровни экспрессии цитокинов, описанных в настоящем описании, используют для улучшения популяции клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, продукта CAR-экспрессирующих клеток, например, продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19, например, клеток STF019) перед инфузией пациентам. В одном варианте осуществления уровни экспрессии цитокинов, описанных в настоящем описании, обеспечивают конечный результат в процессе оптимизации процесса производства.

Цитотоксичность можно оценивать посредством стандартного анализа высвобождения  $^{51}\text{Cr}$ , например, как описано в абзаце 701 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Для оценки специфического транспорта и пролиферации CAR в моделях на животных, имеющих опухоль, можно использовать технологии визуализации, например, как описано в абзаце 702 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Также для оценки CAR, описанных в настоящем описании, можно использовать другие способы анализа, включая способы анализа, описанные в разделе "Примеры" настоящего описания, а также способы анализа, которые известны в данной области.

Альтернативно или в комбинации со способами, описанными в настоящем описании, описаны способы и композиции для одного или нескольких из: обнаружения и/или количественного определения CAR-экспрессирующих клеток (например, *in vitro* или *in vivo* (например, клинический мониторинг)); экспансии и/или активации иммунных клеток; и/или CAR-специфической селекции, которые вовлекают применение лиганда CAR. В одном иллюстративном варианте осуществления лиганд CAR представляет собой антитело, которое связывается с молекулой CAR, например, связывается с внеклеточным антигенсвязывающим доменом CAR (например, антитело, которое связывается с антигенсвязывающим доменом, например, антиидиотипическое антитело; или антитело, которое связывается с константной областью внеклеточного связывающего домена). В других вариантах осуществления лиганд CAR представляет собой молекулу антигена CAR (например, молекулу антигена CAR, как описано в

настоящем описании).

В одном аспекте описан способ обнаружения и/или количественного определения CAR-экспрессирующих клеток. Например, лиганд CAR можно использовать для обнаружения и/или количественного определения CAR-экспрессирующих клеток *in vitro* или *in vivo* (например, клинический мониторинг CAR-экспрессирующих клеток у пациента или дозирование пациенту). Способ включает:

предоставление лиганда CAR (необязательно, меченого лиганда CAR, например, лиганда CAR, который включает метку, гранулу, радиоактивную или флуоресцентную метку);

получение CAR-экспрессирующей клетки (например, получение образца, содержащего CAR-экспрессирующие клетки, как например, производство образца, или клинического образца);

приведение в контакт CAR-экспрессирующей клетки с лигандом CAR в условиях, при которых происходит связывание, тем самым осуществляя определение уровня (например, количества) присутствующих CAR-экспрессирующих клеток. Обнаружение связывания CAR-экспрессирующей клетки с лигандом CAR можно проводить с использованием стандартных способов, таких как FACS, ELISA и т.п.

В другом аспекте описан способ увеличения в количестве и/или активации клеток (например, иммунных эффекторных клеток). Способ включает:

предоставление CAR-экспрессирующей клетки (например, первой CAR-экспрессирующей клетки или временно экспрессирующей CAR-клетки);

приведение в контакт CAR-экспрессирующей клетки с лигандом CAR, например, лигандом CAR, как описано в настоящем описании), в условиях, при которых происходит экспансия и/или пролиферация иммунных клеток, тем самым продуцируя популяцию активированных и/или увеличенных в количестве клеток.

В определенных вариантах осуществления лиганд CAR находится на (например, иммобилизован на или связан с) подложке, например, не встречающейся в природе подложке). В некоторых вариантах осуществления подложка представляет собой неклеточную подложку. Неклеточная подложка может представлять собой твердую подложку, выбранную, например, из планшета (например, микропланшет для титрования), мембраны (например, нитроцеллюлозная мембрана), матрицы, чипа или гранулы. В некоторых вариантах осуществления лиганд CAR находится в подложке (например, на поверхности подложки). Лиганд CAR может быть иммобилизован, присоединен или ковалентно или нековалентно связан (например, шит) с подложкой. В одном варианте осуществления лиганд CAR связан (например, ковалентно связан) с гранулой. В вышеупомянутых вариантах осуществления популяцию иммунных клеток можно увеличивать в количестве *in vitro* или *ex vivo*. Кроме того, способ может включать культивирование популяции иммунных клеток в присутствии лиганда молекулы CAR, например, с использованием любого из способов, описанных в настоящем описании.

В других вариантах осуществления способ экспансии и/или активации клеток, кроме того, включает добавление второй стимулирующей молекулы, например, CD28. Например, лиганд CAR и вторую стимулирующую молекулу можно иммобилизовывать на подложке, например, одной или нескольких гранулах, тем самым обеспечивая усиленную экспансию и/или активацию клеток.

В другом аспекте, предусматривается способ селекции или экспансии CAR-экспрессирующих клеток. Способ включает приведение в контакт CAR-экспрессирующей клетки с лигандом CAR, как описано в настоящем описании; и селекцию клеток на основе связывания лиганда CAR.

В других вариантах осуществления предусматривается способ истощения, снижения уровня и/или уничтожения CAR-экспрессирующих клеток. Способ включает приведение в контакт CAR-экспрессирующей клетки с лигандом CAR, как описано в настоящем описании; и нацеливание на клетку на основе связывания лиганда CAR, тем самым, уменьшая количество и/или вызывая гибель CAR-экспрессирующих клеток. В одном варианте осуществления лиганд CAR связан с токсичным средством (например, токсин или разрушающее клетки лекарственное средство). В другом варианте осуществления антиидиотипическое антитело может вызывать активность эффекторных клеток, например, активность ADCC или ADC.

Иллюстративные антитела против CAR, которые можно использовать в способах, описанных в настоящем описании, описаны, например, в WO 2014/190273 и Jena et al., "Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials", PLOS March 2013 8:3 e57838, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

В некоторых аспектах и вариантах осуществления композиции и способы, описанные в настоящем описании, оптимизированы для конкретной подгруппы Т-клеток, например, как описано в заявке США с серийным номером № PCT/US2015/043219, поданной 31 июля 2015 года, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления оптимизированные подгруппы Т-клеток проявляют увеличенное персистирование по сравнению с контрольными Т-клетками, например, Т-клетками другого типа (например, CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup>), экспрессирующими ту же конструкцию.

В некоторых вариантах осуществления CD4<sup>+</sup> Т-клетка содержит CAR, описанный в настоящем описании, который содержит внутриклеточный сигнальный домен, подходящий для (например, оптимизированный для, например, обеспечивающий увеличенное персистирование) CD4<sup>+</sup> Т-клетки, например, домен ICOS. В некоторых вариантах осуществления CD8<sup>+</sup> Т-клетка содержит CAR, описанный в настоящем описании, который содержит внутриклеточный сигнальный домен, подходящий для (например, оптимизированный для, например, обеспечивающий увеличенное персистирование) CD8<sup>+</sup> Т-клетки, например, домен 4-1BB, домен CD28 или другой костимулирующий домен, отличный от домена ICOS. В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в настоящем описании, содержит антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем описании, как например, CAR, содержащий антигенсвязывающий домен.

В одном аспекте в рамках настоящего изобретения описан способ лечения индивидуума, например, индивидуума, имеющего злокачественную опухоль. Способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества:

- 1) CD4<sup>+</sup> Т-клеток, содержащих CAR (CAR<sup>CD4+</sup>), содержащий: антигенсвязывающий домен, например, антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем описании; трансмембранный домен; и внутриклеточный сигнальный домен, например, первый костимулирующий домен, например, домен ICOS; и
- 2) CD8<sup>+</sup> Т-клеток, содержащих CAR (CAR<sup>CD8+</sup>), содержащий: антигенсвязывающий домен, например, антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем описании;

трасмембранный домен; и  
 внутриклеточный сигнальный домен, например, вторичный костимулирующий домен, например, домен 4-1BB, домен CD28 или другой костимулирующий домен, отличный от домена ICOS; где CAR<sup>CD4+</sup> и CAR<sup>CD8+</sup> отличаются друг от друга.

Необязательно, способ, кроме того, включает введение:

3) второй CD8+ Т-клетки, содержащей CAR (второй CAR<sup>CD8+</sup>), содержащий: антигенсвязывающий домен, например, антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем описании;

трансмембранный домен; и

внутриклеточный сигнальный домен, где второй CAR<sup>CD8+</sup> содержит внутриклеточный сигнальный домен, например, костимулирующий сигнальный домен, не присутствующий на CAR<sup>CD8+</sup>, и необязательно не содержит сигнальный домен ICOS.

### **Транфекция РНК**

В рамках настоящего изобретения описаны способы продуцирования транскрибированной *in vitro* РНК CAR. РНК CAR и способы ее применения описаны, например, в абзацах 553-570 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В одном варианте осуществления транскрибированную *in vitro* РНК CAR можно вводить в клетку посредством временной трансфекции. РНК может иметь 3'-UTR, 5'-UTR или обе из них. 5'-UTR может содержать последовательность Kozak. РНК может содержать IRES. РНК содержать 5'-кэп. РНК может содержать последовательность поли-А. РНК можно получать с использованием ДНК-матрицы, которая содержит промотор, например, промотор T7, T7 или SP6. РНК можно вводить в клетки-мишени с использованием любого из ряда различных способов, например, коммерчески доступных способов, которые включают, но не ограничиваются ими, электропорацию, Gene Pulser II, Multiporator, опосредуемую катионными липосомами трансфекцию с использованием липофекции, инкапсулирование в полимер, опосредуемую пептидом трансфекцию или биолистические системы доставки частиц, такие как "генные пушки".

### **Невирусные способы доставки**

В некоторых аспектах невирусные способы доставки можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, описанный в настоящем описании, в клетку, или ткань, или индивидууму. Подходящие невирусные способы доставки включают транспозоны (например, Sleeping Beauty, piggyBac и транспозоны на основе рT2). Иллюстративные невирусные способы доставки и способы их применения описаны, например, в абзацах 571-579 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

### **Способы производства/продуцирования**

В одном аспекте способы производства CAR-экспрессирующих клеток согласно изобретению описаны в настоящем описании (например, в разделе "Источник клеток" и "Активация и увеличение в количестве клеток").

В одном варианте осуществления предусматривается способ производства CAR-экспрессирующих клеток. Способ включает:

предоставление препарата CAR-экспрессирующих клеток (например, множество CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток, таких как Т-клетки или НК-клетки) (например, клетки, экспрессирующие CAR против CD19, как описано в настоящем описании, например, такие как CTL019);

получение величины уровня (например, определение уровня экспрессии) одного или

нескольких генов, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1 с получением профиля экспрессии генов для образца;

5 (необязательно) сравнение полученного профиля экспрессии генов с исторической записью о профиле экспрессии генов;

определение различий между полученной и исторической экспрессией генов; и регистрацию определенного отличия в протоколе о контроле качества.

10 В одном варианте осуществления предусматриваемые способы включают стадии предоставления препарата CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток), как описано в настоящем описании, например, таких как CTL019);

15 определения уровней экспрессии одного или нескольких генов, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1 с получением профиля экспрессии генов (например, генной сигнатуры) для образца;

20 сопоставления генной сигнатуры с ответом пациента на терапию CAR-экспрессирующей клеткой (например, Т-клеткой, НК-клеткой) (например, клеткой, экспрессирующей CAR против CD19 (например, Т-клеткой, НК-клеткой), как описано в настоящем описании, например, такой как CTL019); и

оптимизации препарата CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) на основе сопоставления генной сигнатуры и ответа пациента перед инфузией пациентам.

25 В одном варианте осуществления предусматриваемые способы включают получение величины уровня (например, определение уровня экспрессии) цитокина, например, одного или нескольких цитокинов, приведенных в таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6) и таблице 17, таблице 18, таблице 20, секретлируемого CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) в ответ на  
30 распознавание антигена. В одном варианте осуществления предусматриваемые способы включают определение уровней экспрессии одного или нескольких из цитокинов CCL20/MIP3а, IL-17а, IL-6 и/или их комбинаций, секретлируемых CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) в ответ на распознавание антигена. В одном варианте осуществления предусматриваемые способы, кроме того, включают  
35 включение цитокинов, секретлируемых CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), например, одного или нескольких цитокинов, приведенных в таблице 14, таблице 15 и таблице 16, в анализ эффективности. В одном варианте осуществления предусматриваемые способы, кроме того, включают включение цитокинов CCL20/MIP3а, IL-17а, IL-6 и/или их комбинаций, в анализ эффективности.

40 В одном варианте осуществления предусматриваемые способы включают включение цитокинов, секретлируемых CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), например, одного или нескольких цитокинов, приведенных в таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6) и таблице 17, в анализ эффективности, и определение того, может ли препарат CAR-экспрессирующих клеток  
45 (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток), как описано в настоящем описании, например, таких как CTL019) иметь клинический эффект. В одном варианте осуществления CCL20/MIP3а, IL-17а, IL-6 и/или их комбинации используют в анализе эффективности для

определения того, может ли препарат CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток), как описано в настоящем описании, например, таких как CTL019) иметь клинический эффект. В одном варианте осуществления предусматриваемые  
5 способы, кроме того, включают коррекцию инфузируемой дозы CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) для достижения клинической эффективности.

В одном варианте осуществления предусматриваемые способы включают стадию предоставления образца крови, например, образца Т-клеток, от индивидуума, имеющего злокачественную опухоль.

10 В одном варианте осуществления предусматриваемые способы, кроме того, включают стадию сравнения полученных отличий профиля экспрессии генов с профилем экспрессии генов эталонном образце.

В одном варианте осуществления эталонный образец представляет собой препарат CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, клеток,  
15 экспрессирующих CAR против CD19, как описано в настоящем описании, например, таких как CTL019) из отличающейся партии клеток относительно партии для продукции терапевтического препарата CAR-экспрессирующих клеток.

В одном варианте осуществления эталонный образец представляет собой образец от здорового донора с произведенным продуктом CAR-экспрессирующих клеток  
20 (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, клеток, экспрессирующих CAR против CD19, как описано в настоящем описании, например, таких как CTL019). В одном варианте осуществления эталонный образец представляет собой образец здорового донора с произведенным продуктом клеток, экспрессирующих CAR против CD19, например, таким как продукт CTL019.

25 В одном варианте осуществления предусматриваемые способы, кроме того, включают стадию регистрации результата сравнения в протоколе о контроле качества для препарата терапевтических CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток).

В одном варианте осуществления определенное отличие сравнивают с исторической  
30 записью для эталонного образца.

В одном варианте осуществления препарат CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) представляет собой препарат клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, CTL019).

35 В одном варианте осуществления препарат CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) включает препарат клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, CTL019).

В одном варианте осуществления препарат CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) состоит из препарата клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, CTL019).

40 В одном аспекте предусматривается способ, включающий:

предоставление образца крови, например, образца Т-клеток, от индивидуума, имеющего злокачественную опухоль;

определение уровней экспрессии одного или нескольких генов, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14  
45 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L или KLRG1, с получением профиля экспрессии генов для образца;

сравнение полученного профиля экспрессии генов с эталонной величиной, например,

исторической записью об экспрессии генов;

определение отличий между полученной и эталонной величиной; и регистрации определенного отличия в протоколе о контроле качества.

Способ может включать стадию сравнения полученных отличий в профиле экспрессии генов с эталонным образцом.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем описании, кроме того, включают введение средства, истощающего Т-клетки, после введения клеток (например, иммунных эффекторных клеток, как описано в настоящем описании), тем самым, снижая уровень (например, истощая) CAR-экспрессирующих клеток (например, клеток, экспрессирующих CAR против CD19). Такие средства, истощающие Т-клетки, можно использовать для эффективного истощения CAR-экспрессирующих клеток (например, клеток, экспрессирующих CAR против CD19) для смягчения токсичности. В некоторых вариантах осуществления CAR-экспрессирующие клетки производили способом, описанным в настоящем описании, например, анализировали (например, до или после трансфекции или трансдукции) в соответствии со способом, описанным в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления средство, истощающее Т-клетки, вводят через одну, две, три, четыре или пять недель после введения клетки, например, популяции иммунных эффекторных клеток, описанной в настоящем описании.

В одном варианте осуществления средство, истощающее Т-клетки, представляет собой средство, которое истощает CAR-экспрессирующие клетки, например, путем индукции антителозависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичности (ADCC) и/или индуцируемой комплементом клеточной гибели. Например, CAR-экспрессирующие клетки, описанные в настоящем описании, также могут экспрессировать антиген (например, антиген-мишень), который распознается молекулами, способными индуцировать клеточную смерть, например, индуцируемую ADCC или комплементом клеточную смерть. Например, CAR-экспрессирующие клетки, описанные в настоящем описании, также могут экспрессировать белок-мишень (например, рецептор), на который может быть нацелено антитело или фрагмент антитела. Примеры таких белков-мишеней включают, но не ограничиваются ими, EpCAM, VEGFR, интегрины (например, интегрины  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 13/4\beta 3$ ,  $\alpha 4\beta 7$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v$ ), представители суперсемейства рецепторов TNF (например, TRAIL-R1, TRAIL-R2), рецептор PDGF, рецептор интерферона, рецептор фолатов, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, рецептор IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/рецептор IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/басигин, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7 и EGFR, и их укороченные версии (например, версии, в которых сохранены один или несколько внеклеточных эпитопов, но которые лишены одной или нескольких областей в цитоплазматическом домене).

В некоторых вариантах осуществления CAR-экспрессирующая клетка коэкспрессирует CAR и белок-мишень, например, экспрессирует естественным образом белок-мишень или модифицирована способами инженерии для экспрессии белка-мишени. Например, клетка, например, популяция иммунных эффекторных клеток, может включать нуклеиновую кислоту (например, вектор), включающую нуклеиновую кислоту CAR (например, нуклеиновую кислоту CAR, как описано в настоящем описании) и нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-мишень.

В одном варианте осуществления истощающее Т-клетки средство представляет собой ингибитор CD52, например, молекулу антитела против CD52, например, алемтузумаб.



В других вариантах осуществления клетка, например, популяция иммунных эффекторных клеток, экспрессирует молекулу CAR, как описано в настоящем описании (например, CAR против CD19) и белок-мишень, распознаваемый средством, истощающим Т-клетки. В одном варианте осуществления белок-мишень представляет собой CD20. В некоторых вариантах осуществления, в которых белок-мишень представляет собой CD20, истощающее Т-клетки средство представляет собой антитело против CD20, например ритуксимаб.

В следующих вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов способы, кроме того, включают трансплантацию клетки, например, гемопоэтической стволовой клетки, или костного мозга млекопитающему.

В другом аспекте изобретение относится к способу адаптации млекопитающего перед трансплантацией клеток. Способ включает введение млекопитающему эффективного количества клеток, содержащих нуклеиновую кислоту или полипептид CAR, например, нуклеиновую кислоту или полипептид CAR против CD19. В некоторых вариантах осуществления трансплантация клеток представляет собой трансплантацию стволовых клеток, например, трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток или трансплантацию костного мозга. В других вариантах осуществления адаптация индивидуума перед трансплантацией клеток включает снижение количества экспрессирующих мишень клеток у индивидуума, например, экспрессирующих CD19 нормальных клеток или экспрессирующих CD19 злокачественных клеток.

#### **Конструкции нуклеиновых кислот, кодирующие CAR**

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие одну или несколько конструкций CAR, моно вводят в иммунную эффекторную клетку (например, Т-клетку), как описано в настоящем описании. В одном аспекте молекулу нуклеиновой кислоты предоставляют в качестве матричной РНК-транскрипта. В одном аспекте молекулу нуклеиновой кислоты предоставляют в качестве конструкции ДНК.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем описании, вводят в клетку, которую анализировали способом, описанным в настоящем описании, например, в которой анализировали один или несколько биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем описании, анализируют способом, описанным в настоящем описании, например, анализируют один или несколько биомаркеров.

Молекулы нуклеиновых кислот, описанные в настоящем описании, могут представлять собой молекулу ДНК, молекулу РНК или их комбинацию. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК, кодирующую полипептид CAR, как описано в настоящем описании. В других вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вектор, который включает любую из вышеупомянутых молекул нуклеиновых кислот.

Молекулы нуклеиновых кислот могут кодировать, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании, и они могут содержать, например, последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании, например, в таблице 11, таблице 12 или таблице 13.

Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие желаемые молекулы, можно получать с использованием рекомбинантных способов, известных в данной области, например, таких как скрининг библиотек клеток, экспрессирующих ген, получение гена из вектора, о котором известно, что он его включает, или выделение непосредственно из клеток или тканей, содержащих его, с использованием стандартных способов. Альтернативно представляющий интерес ген может получать способами синтеза, а не

клонировать.

Также описаны векторы, в которые встроена ДНК по настоящему изобретению. Векторы, происходящие из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долговременного переноса генов, поскольку они обеспечивают долговременное стабильное встраивание трансгена и его увеличение в количестве в дочерних клетках. Лентивирусные векторы имеют дополнительное преимущество над векторами, происходящими из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкоза мыши, поскольку они могут трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Также они имеют дополнительное преимущество, состоящее в низкой иммуногенности. Ретровирусный вектор также может представлять собой, например, гамма-ретровирусный вектор. Гамма-ретровирусный вектор может включать, например, промотор, сигнал упаковывания ( $\psi$ ), участок связывания праймера (PBS), один или несколько (например, два) длинных концевых повторов (LTR) и представляющий интерес трансген, например, ген, кодирующий CAR. Гамма-ретровирусный вектор может быть лишен структурных генов вируса, таких как gag, pol и env. Иллюстративные гамма-ретровирусные векторы включают вирус лейкоза мышей (MLV), вирус некроза селезенки (SFFV) и вирус миелопролиферативной саркомы (MPSV), и векторы, происходящие из них. Другие гамма-ретровирусные векторы описаны, например, в Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" *Viruses*. 2011 Jun; 3(6): 677-713.

В другом варианте осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую желаемый CAR по изобретению, представляет собой аденовирусный вектор (A5/35). В другом варианте осуществления экспрессию нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, можно проводить с использованием транспозонов, таких как sleeping beauty, crisper, CAS9 и нуклеазы с цинковыми пальцами. См. ниже June *et al.* 2009 *Nature Reviews Immunology* 9,10: 704-716, включенную в настоящее описание в качестве ссылки.

В кратком изложении, экспрессии природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, обычно достигают путем функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CAR или его части, с промотором, и встраивания конструкции в экспрессирующий вектор. Векторы могут быть пригодными для репликации и встраивания у эукариот. Типичные клонирующие векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промотор, пригодные для регуляции экспрессии желаемой последовательности нуклеиновой кислоты.

Экспрессирующие конструкции также можно использовать для иммунизации нуклеиновыми кислотами и генной терапии с использованием стандартных протоколов доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области. См., например, патенты США № 5399346, 5580859, 5589466, включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. В другом варианте осуществления изобретение относится к вектору для генной терапии.

Нуклеиновую кислоту можно клонировать в множество типов векторов. Например, нуклеиновую кислоту можно клонировать в вектор, включающий, но не ограничивающийся ими, плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус животных и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают экспрессирующие векторы, реплицирующиеся векторы, векторы для получения зондов и векторы для секвенирования.

Кроме того, экспрессирующий вектор может быть предоставлен клетке в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области

и описана, например, в Sambrook *et al.*, 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), и в других справочниках по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые пригодны в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Как правило, подходящий вектор содержит ориджин репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, удобные участки для эндонуклеаз рестрикции, и один или несколько селективных маркеров (например, WO 01/96584; WO 01/29058 и патент США № 6326193).

10 Был разработан ряд систем на основе вирусов для переноса генов в клетки млекопитающих. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген можно встраивать в вектор и упаковывать в ретровирусные частицы с использованием способов, известных в данной области. Затем рекомбинантный вирус можно выделять и доставлять в клетки индивидуума либо *in vivo*, либо *ex vivo*. В данной области известен ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления используют аденовирусные векторы. В данной области известен ряд аденовирусных векторов. В одном варианте осуществления используют лентивирусные векторы.

Дополнительные промоторные элементы, например энхансеры, регулируют частоту инициаций транскрипции. Как правило, они расположены в области на 30-110 п.о. выше участка инициации, хотя было показано, что ряд промоторов также содержат функциональные элементы ниже участка инициации. Спейсер между промоторными элементами часто является гибким, так что промоторная функция сохраняется, когда элементы инвертируются или смещаются друг относительно друга. В промоторе тимидинкиназы (tk) спейсер между промоторными элементами может быть увеличен до 50 п.о. до того, когда активность начнет снижаться. Оказалось, что в зависимости от промотора индивидуальные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо, активируя транскрипцию. Иллюстративные промоторы включают промоторы гена IE CMV, EF-1 $\alpha$ , убиквитина C или фосфоглицерокиназы (PGK).

30 Примером промотора, который способен экспрессировать трансген CAR в Т-клетке млекопитающего, является промотор EF1 $\alpha$ . Нативный промотор EF1 $\alpha$  контролирует экспрессию альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации 1, который ответственен за ферментативную доставку аминоксил-тРНК в рибосому. Промотор EF1 $\alpha$  широко используют в экспрессирующих плаزمиде млекопитающих, и было показано, что он является эффективным для запуска экспрессии CAR с трансгенов, клонированных в лентивирусный вектор. См., например, Milone *et al.*, Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). В одном аспекте промотор EF1 $\alpha$  содержит последовательность, представленную в качестве SEQ ID NO: 11.

Другим примером промотора является последовательность предраннего промотора цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная последовательность представляет собой последовательность мощного конститутивного промотора, способного обеспечивать высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ним. Однако также можно использовать другие конститутивные промоторные последовательности, включая, но не ограничиваясь ими, ранний промотор вируса 40 обезьян (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, предранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы

генов человека, такие как, но не ограничиваясь ими, промотор актина, промотор миозина, промотор фактора элонгации  $1\alpha$ , промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Кроме того, изобретение не ограничивается применением конститутивных промоторов. Также в качестве части изобретения предусматриваются индуцибельные промоторы. Применение индуцибельных промоторов обеспечивает молекулярный переключатель, способный запускать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда такая экспрессия желательна, или выключать экспрессию, когда экспрессия является нежелательной. Примеры индуцибельных промоторов включают, но не ограничиваются ими металлотиониновый промотор, гликокортикоидный промотор, прогестероновый промотор и тетрациклиновый промотор.

Другим примером промотора является промотор фосфоглицераткиназы (PGK). В некоторых вариантах осуществления может быть желательным укороченный промотор PGK (например, промотор PGK с одной или несколькими, например, 1, 2, 5, 10, 100, 200, 300 или 400, нуклеотидными делециями по сравнению с промоторной последовательностью PGK дикого типа).

Также вектор может включать, например, сигнальную последовательность для облегчения секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (например, из гена бычьего гормона роста (BGH)), элемент, позволяющий эписомальную репликацию и репликацию у прокариот (например, ориджин SV40 и ColE1 или другие, известные в данной области) и/или элемент, позволяющие селекцию (например, ген устойчивости к ампициллину и/или зеоциновый маркер).

Для оценки экспрессии полипептида CAR или его частей экспрессирующий вектор, подлежащий введению в клетку, также может содержать либо ген селективного маркера, либо репортерный ген, или оба из них, для облегчения идентификации и селекции экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые намереваются трансфицировать или инфицировать вирусными векторами. В других аспектах селективный маркер может содержаться на отдельном фрагменте ДНК и использоваться в методике сотрансфекции. Как селективные маркеры, так и репортерные гены, могут фланкироваться соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Пригодные селективные маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как нео и т.п.

Репортерные гены используют для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. Репортерные гены описаны, например, в абзаце 599 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать две или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, например, CAR, описанный в настоящем описании, например, CAR против CD19, и второй CAR, например, ингибиторный CAR или CAR, который специфически связывается с антигеном, отличным от CD19. В таких вариантах осуществления две или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих CAR, кодируются одной молекулой нуклеиновой кислоты в той же рамке считывания, что и одна полипептидная цепь. В этом аспекте два или более CAR, например, могут быть разделены одним или несколькими участками расщепления пептидов (например, участок ауторасщепления или субстрат для внутриклеточной протеазы). Примеры участков расщепления пептидов включают участки T2A, P2A, E2A или F2A.

Способы введения и экспрессии генов в клетках известны в данной области. В контексте экспрессирующего вектора вектор может быть легко введен в клетку-хозяина, например, клетку млекопитающих, бактерий, дрожжей или насекомых, любым способом, известным в данной области. Например, экспрессирующий вектор можно переносить в клетку-хозяина физическим, химическим или биологическим способами, например, способами, описанными в абзацах 601-603 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В случае, когда используют невирусную систему доставки, иллюстративным носителем для доставки является липосома. Для введения нуклеиновых кислот в клетку (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*) предусматривается применение липидных составов, и оно описано, например, в абзацах 604-605 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Независимо от способа, использованного для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иного воздействия на клетку ингибитора по настоящему изобретению, для подтверждения присутствия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине можно проводить различные анализы. Такие анализы включают, например, "молекулярно-биологические" анализы, хорошо известные специалистам в данной области, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; "биохимические" анализы, такие как обнаружение присутствия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими способами (ELISA и вестерн-блоттинг), или анализы, описанные в настоящем описании, для идентификации средств, входящих в объем изобретения.

#### Способы терапии

В одном аспекте изобретение относится к способам лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией опухолевого антигена, описанного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки анализируют способом, описанным в настоящем описании, например, анализируют один или несколько биомаркеров, и клетки вводят индивидууму в качестве части лечения, описанного в настоящем описании. Например, иммунные эффекторные клетки можно вводить в качестве части комбинированной терапии, описанной в настоящем описании.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), модифицированных способами инженерии для экспрессии CAR. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой ALL (острый лимфобластный лейкоз), CLL (хронический лимфоцитарный лейкоз), DLBCL (диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома), MCL (лимфома из клеток мантийной зоны) или MM (множественная миелома).

В одном аспекте изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), сконструированных для экспрессии CAR против CD19, где злокачественные клетки экспрессируют CD19. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой

В-клеточную злокачественную опухоль. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой ALL (острый лимфобластный лейкоз), CLL (хронический лимфоцитарный лейкоз), DLBCL (диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома), MCL (лимфома из клеток мантийной зоны), лимфома Ходжкина или MM (множественная миелома).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), модифицированных способами инженерии для экспрессии CAR против CD22, где злокачественные клетки экспрессируют CD22. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой ALL (острый лимфобластный лейкоз), CLL (хронический лимфоцитарный лейкоз), DLBCL (диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома), MCL (лимфома из клеток мантийной зоны), лимфому Ходжкина или MM (множественная миелома).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), модифицированных способами инженерии для экспрессии CAR против CD20, где злокачественные клетки экспрессируют CD20. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой ALL (острый лимфобластный лейкоз), CLL (хронический лимфоцитарный лейкоз), DLBCL (диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома), MCL (лимфома из клеток мантийной зоны), лимфому Ходжкина или MM (множественная миелома).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), модифицированных способами инженерии для экспрессии CAR против ROR1, где злокачественные клетки экспрессируют ROR1. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой ALL (острый лимфобластный лейкоз), CLL (хронический лимфоцитарный лейкоз), DLBCL (диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома), MCL (лимфома из клеток мантийной зоны), лимфому Ходжкина или MM (множественная миелома).

Изобретение относится к типу клеточной терапии, где иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки) генетически модифицируют (например, посредством трансдукции лентивирусного вектора) для экспрессии CAR и CAR-экспрессирующую клетку инфузируют реципиенту, нуждающемуся в этом. Инфузированная клетка способна уничтожать опухолевые клетки у реципиента. В отличие от терапии антителами, модифицированные посредством CAR иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки) способны реплицироваться *in vivo*, что приводит к

долговременной персистенции, которая может приводить к длительному контролю опухоли. CAR-экспрессирующие клетки (например, Т-клетки или НК-клетки), полученные с использованием лентивирусных векторов, имеют стабильную экспрессию CAR. В различных аспектах иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки), вводимые пациенту, или их потомство, сохраняются у пациента в течение по меньшей мере четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев, тринадцати месяцев, четырнадцати месяцев, пятнадцати месяцев, шестнадцати месяцев, семнадцати месяцев, восемнадцати месяцев, девятнадцати месяцев, двадцати месяцев, двадцати одного месяца, двадцати двух месяцев, двадцати трех месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет после введения Т-клеток пациенту.

Также изобретение относится к типу клеточной терапии, в которой иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки) модифицируют, например, посредством РНК, транскрибированной *in vitro*, для временной экспрессии CAR и CAR-экспрессирующую клетку вводят путем инфузии реципиенту, нуждающемуся в этом. CAR-экспрессирующие клетки (например, Т-клетки, НК-клетки), полученные посредством трансдукции РНК CAR (например, путем трансфекции или электропорации), временно экспрессируют РНК CAR в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 суток после трансдукции. Инфуцированная клетка способна уничтожить опухолевые клетки у реципиента. Таким образом, в различных аспектах иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки), вводимые пациенту, персистируют в течение менее чем одного месяца, например, трех недель, двух недель, одной недели, после введения пациенту Т-клеток.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), модифицированных способами инженерии для экспрессии CAR, например, CAR, описанного в настоящем описании.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), модифицированных способами инженерии для экспрессии CAR, который специфически нацелен или связывается с опухолевым антигеном (или ассоциированным со злокачественной опухолью антигеном), описанным в настоящем описании, где индивидуум идентифицирован как отвечающий или частично отвечающий индивидуум. В других вариантах осуществления способы предусматривают лечение злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) у частично отвечающего индивидуума или не отвечающего индивидуума путем предоставления индивидууму терапии злокачественной опухоли, отличной от терапии CAR, например, путем предоставления индивидууму лечения, которое является стандартным для конкретного типа злокачественной опухоли. В другом варианте осуществления способ лечения включает изменение производства CAR-экспрессирующих клеток для увеличения в количестве наивных Т-клеток, например, как описано в настоящем описании, для индивидуума, идентифицированного как частично отвечающий или не отвечающий индивидуум, перед введением CAR-экспрессирующей клетки, например, CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании.

В одном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки) модифицируют способами инженерии для экспрессии CAR против CD19 для лечения индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как ALL и CLL), где злокачественные клетки экспрессируют CD19. В одном варианте осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой ALL или CLL. Молекулы CAR против CD19, подлежащие экспрессии в иммунной эффекторной клетке, могут содержать любой антигенсвязывающий домен против CD19, известный в данной области (например, антигенсвязывающие домены, представленные в таблице 12) в комбинации с любым доменом CAR, описанным в настоящем описании, для получения полной конструкции CAR. Например, полная конструкция CAR представляет собой CAR, приведенный в таблице 13. В таблице 13 предоставлены иллюстративные полные конструкции CAR против CD19, полученные с использованием различных доменов CAR (например, трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены), приведенных в таблице 12, и антигенсвязывающих доменов против CD19, приведенных в таблице 12. Аминокислотные последовательности обозначают (а.к.) и последовательности нуклеиновых кислот обозначают (nt).

Таблица 13. Конструкции CAR против CD19

Название	Последовательность
104875 CAR 1 - полная - nt	CAR 1
	atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcccgtcggcccga aattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtgagcgcgcaaccctgtctt gcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcct cgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcgg atctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttct gtcagcaagggaaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtgga ggtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggacc gggctctgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccg attacggggtgtcttgatcagacagccaccggggaagggctggaatggattggagtgatttgg ggctctgagactacttactactcttcatccctcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactc taagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcccgtgactattgcg ctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtagctctggtcacc gtgtccagcaccactaccccagcaccgagggccaccaccccggctcctaccatcgctcccagcc tctgtccctgctccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttg acttcgctgcgatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttca ctcgtgatcactctttactgtaagcgcggctcggagaagctgctgtacatctttaagcaaccctt catgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggg cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggcggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggccctgtaca acgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcaga agaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgc tcttcacatgcaggccctgccgcctcgg (SEQ ID NO: 55)





5

10

15

20

25

104877  
CAR3- полная - nt

atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccaca  
 agtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgca  
 ccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagga  
 ctggagtggatcggagtgatttggggtagcgaaccacttactattcatcttccctgaagtcacg  
 ggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccg  
 ctgacaccgccgtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactac  
 tggggccaggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcgg  
 tggagggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtccctttctcccggggaac  
 gggctaccctttctgtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggatcaacagaag  
 ccgggacaggcccctaggcttcttactaccacacctctcgctcatagcgggattcccgcacg  
 ctttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggact  
 tcgccgtctacttctgccagcagggtaaacacctgccgtacacctcgccagggcaccaagctt  
 gagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgccccgaccatcgctctcagcc  
 gctttccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggcttg  
 acttcgctgcgatctacatttgggcccctctggctggtacttgccggggtcctgctgctttca  
 ctgctgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctt  
 catgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg  
 aaggcggctgcaactgcgcgtgaaattcagccgcagcagatgctccagcctacaagcagggg  
 cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcgagagaggagtacgacgtgctggacaagcg  
 gagaggacgggaccagaaatgggcccgaagccgcagaaagaatccccagagggcctgtaca  
 acgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggatgaaaggggaacgcaga  
 agaggcaaaggccacgacggactgtaccaggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgc  
 tcttcacatgcaggccctgccgctcgg (SEQ ID NO: 59)

30

35

104877  
CAR3 - полная -  
а.к.

MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkq  
 lewigviwgsettyysslksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyyca  
 wgggtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatlsispgeratlsccrasqdiskylnwyqqk  
 pggaprlliyhtsrllhsqiparfsgsgsdtlyltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkl  
 eiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllls  
 lvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtteedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg  
 qnqlynelnlgrreedydvlkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerr  
 rgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO: 60)

CAR 4

40

45

5

10

15

20

25

104878  
CAR 4 - полная -  
nt

atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccaca  
agtcacagcttcaagaatcagggcctggctctgggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgca  
ccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagga  
ctggagtggatcggagtgatttggggtagcgaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacg  
ggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccg  
ctgacaccgccgtgtattactgtgccaagcattactactatggagggctcctacgccatggactac  
tggggccaggaactctggctactgtgtcatctggaggaggagtagcggaggaggcgggagcgg  
tggaggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcccttctcccggggaac  
gggctacccttcttctgctgggcatcacaagatatctcaaaatcctcaattggatcaacagaag  
ccgggacaggcccctaggtcttcttaccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacg  
ctttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggact  
tcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagctt  
gagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgccccgaccatcgctctcagcc  
gcttccctgctcggaggcatgtagaccgcagctggggggcctgcataccggggctcttg  
acttcgctgcatatctacatttgggcccctctggctggtagcttgggggctctgctgcttca  
ctcgtgatcactcttactgtaagcgcggctcgaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctt  
catgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggtcccagaggaggagg  
aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcagatgctccagcctacaagcagggg  
cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg  
gagaggacgggaccagaaatgggcggaagccgcgagaaagaatccccaagaggcctgtaca  
acgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggatgaaaggggaacgcaga  
agaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgc  
tcttcacatgcaggccctgccgctcgg (SEQ ID NO: 61)

30

35

104878  
CAR 4 - полная -  
а.к.

MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpselstctvsgvslpdygvswirppgkg  
lewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamdy  
wgqgtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqk  
pgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkl  
eiktttpprptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtrglfacdiyiwaplagtcgvllls  
lvitlyckrgrklliyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpееееggcelrvkfsrsadapaykqg  
qnqlynelnlgrreeydvlkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeayseigmkger  
rgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO: 62)

CAR 5

40

CAR5 scFv-домен

eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgs  
gsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikggggsgggsgggsgggsgvq  
lqesgpglvkpselstctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyysssllksrvt  
iskdnknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss (SEQ ID NO:  
63)

45

5

10

15

20

25

104879  
CAR 5 - полная -  
нт

atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcccgtcgggccga  
aattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtgagcgcgaaccctgtctt  
gcagagcctccaagacatctcaaaatccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcct  
cgcttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccagggtcagcggtagcgg  
atctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttgcgtgtctatttct  
gtcagcaagggaaacacctgcctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtgga  
gggtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagcggcggaggcgggagccaggtccaact  
ccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgtactgtgagcg  
gagtgctctccccgattacgggggtgcttggatcagacagccaccggggaaggggtctggaatgg  
attggagtgatttggggctctgagactacttactactcttcatccctcaagtcaagcgtcaccat  
ctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccg  
ccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag  
ggtagctctgggtcacctgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccacccccggctcctac  
catcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggggggccgtgc  
atacccggggtcttgacttcgctgcgatatctacatttgggccccctctggctggtacttgcggg  
gtcctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtaaagcgggtcggaagaagctgctgtacat  
ctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgggt  
tcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctcca  
gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacga  
cgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccc  
aagagggcctgtacaacgagctcaaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattgggatg  
aaaggggaacgcagaagaggcaaagccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaa  
ggacacctatgacgctcttcacatgcaggcctgccgcctcgg (SEQ ID NO: 64)

30

35

104879  
CAR 5 - полная -  
а.к.

MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqap  
rlliyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikgg  
ggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglew  
igviwgsettyyssslksrvtiskdsknqvs1klssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq  
gtlvtvssttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtgcg  
vllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadap  
aykqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeyseigm  
kgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO: 65)

CAR 6

40

45

5

10

15

20

25

104880 CAR6 -  
полная - пт

atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcccgtcggcccga  
aattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtgagcgcgcaaccctgtctt  
gcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcct  
cgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcgg  
atctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttct  
gtcagcaaggaacaccctgcctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtgga  
gggtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagcggaggcggaggaggccaggtccaact  
ccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcg  
gagtgtctctccccgattacgggggtgcttggatcagacagccaccggggaagggctggaatgg  
attggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtacgcgctcaccat  
ctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccg  
ccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag  
ggactctgggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggctcctac  
catcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgc  
ataccgggggtcttgacttcgctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggg  
gtcctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtaagcgcggctcggagaagctgctgtacat  
ctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggt  
tcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctcca  
gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacga  
cgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccc  
aagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtag  
aaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaa  
ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg (SEQ ID NO: 66)

30

35

104880 CAR6 -  
полная - а.к.

MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqap  
rlliyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfqqqntlpytfgqgkkleikgg  
ggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlslctvsgvslpdygvswirpppgkglew  
igviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvs1klssvtaadtavyycakhyyyggsyandywgq  
gtlvtvssttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtgc  
vllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadap  
aykqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigm  
kgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO: 67)

CAR 7

40

45

5

10

15

20

25

104881 CAR 7 пол-  
ная - nt

atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccaca  
 agtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgca  
 ccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggga  
 ctggagtggatcggagtgatttggggtagcgaaccacttactattcatcttccctgaagtacg  
 ggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccg  
 ctgacaccgccgtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactac  
 tggggccagggaaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcgg  
 tggaggtggctccggaggtggcggaaagcgaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtccc  
 tttctcccggggaacgggctacccttcttctgctcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaat  
 tgggatcaacagaagccgggacagggcccctaggcttcttatctaccacacctctcgctgcatag  
 cgggattcccgcacgctttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctc  
 tccagcccaggacttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggc  
 cagggcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgccccgac  
 catcgctctcagccgctttccctgctccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgc  
 ataccgggggtcttgacttcgctgcgatctacatttgggcccctctggctggtacttgccggg  
 gtctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaaagcgggtcggaagaagctgctgtacat  
 cttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggt  
 tcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctcca  
 gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacga  
 cgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccc  
 aagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatg  
 aaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccaggactcagcaccgccaccaa  
 ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg (SEQ ID NO: 68)

30

35

104881 CAR 7 пол-  
ная - а.к.

MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkg  
 lewigviwgsettyysslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamdy  
 wqggtlvtvssgggsgggsgggsggggseivmtqspatlslspgeratlsccrasqdiskyln  
 wyqqkpgqaprlliyhtsrllhsqiparfsgsgsdtlyltisslqpedfavyfcqqntlpytfg  
 qgtkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtgcg  
 vllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadap  
 aykqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeayseigm  
 kgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO: 69)

CAR 8

40

45

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45

<p>104882 CAR 8 - полная - nt</p>	<p>atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccaca                  agtccagcttcaagaatcagggcctggctgggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgca                  ccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagga                  ctggagtggatcggagtgatttggggtagcgaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacg                  ggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccg                  ctgacaccgccgtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactac                  tggggccagggactctggctcactgtgtcatctggaggagggtagcggaggaggcgggagcgg                  tggagggtggctccggaggcgggtgggtcagaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtccc                  tttctcccggggaacgggctaccctttcttctgctgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaat                  tggatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttctaccacacctctgcctgcatag                  cgggattcccgcacgctttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctc                  tcagcccaggacttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggc                  cagggcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgccccgac                  catgcctctcagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgc                  ataccggggctcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggg                  gtctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtgaagcgcggtcggaagaagctgctgtacat                  ctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggt                  tcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctcca                  gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacga                  cgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccc                  aagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatg                  aaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaa                  ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg (SEQ ID NO: 70)</p>
<p>104882 CAR 8 - полная - a.k.</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkg                  lewigviwgsettyygsslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamdy                  wqggtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlsispgeratlsccrasqdiskyln                  wyqqkpgqaprlliyhtsrllhsqiparfsgsgsdytltisslqpedfavyfcccqgntlpytfg                  qgtkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtgcg                  vllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadap                  aykqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigm                  kgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO: 71)</p>
<p>CAR 9</p>	



5

10

15

20

25

105974  
CAR 9 - полная -  
nt

atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccga  
aattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccggtgagcgcgcaacctgtctt  
gcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggtcct  
cgccttctgatctaccacaccagccggtccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcgg  
atctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttct  
gtcagcaagggaaacacctgacctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtgga  
gggtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagcggaggcgggtgggagccaggtccaact  
ccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcg  
gagtgtctctccccgattacgggggtgcttggatcagacagccaccggggaaggtctggaatgg  
attggagtgatttggggctctgagactacttactacaactcatccctcaagtacgcgctcacat  
ctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccg  
ccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag  
ggactctgggtaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggtcctac  
catcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggcctgc  
atacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggccctctggctggtacttgcggg  
gtcctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacat  
ctttaagcaaccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggt  
tcccagaggaggaggaagcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctcca  
gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacga  
cgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccc  
aagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatg  
aaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaa  
ggacacctatgacgctcttcacatgcaggcctgccgcctcgg (SEQ ID NO: 72)

30

35

105974  
CAR 9 - полная -  
а.к.

MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqap  
rlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikgg  
ggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppegkglew  
igviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq  
gtlvtvssttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtgcg  
vllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeeggcelrvkfsrsadap  
aykqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeyseigm  
kgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO: 73)

CAR10

40

45



5

10

15

20

25

105975 CAR 10  
полная - nt

atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcctcgcccgca  
aattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccggtgagcgcgcaaccctgtctt  
gcagagcctccaagacatctcaaaataccttaattggatcaacagaagcccggacaggctcct  
cgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccagggtcagcggtagcgg  
atctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttct  
gtcagcaaggaacaccctgcctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtgga  
gggtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagcggaggcgggtgggagccagggtccaact  
ccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcg  
gagtgtctctccccgattacgggggtgtcttgatcagacagccaccggggaagggtctggaatgg  
attggagtgatttggggctctgagactacttactacaactcatccctcaagtcacgcgtcacct  
ctcaaaggacaactctaagaatcagggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccg  
ccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag  
ggtagctctgggtcacctgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggtcctac  
catcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggcctgc  
ataccgggggtcttgacttcgctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtagcttgcggg  
gtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggctcggaagaagctgctgtacat  
ctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggg  
tcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctcca  
gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacga  
cgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcggaagccgcgcagaaagaatcccc  
aagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtag  
aaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca  
ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg (SEQ ID NO: 74)

30

35

105975  
CAR 10 полная -  
а.к.

MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN WYQQKPGQAP  
RLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQOGNTLPYTFGQGTKLEIKGG  
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLP DYGVSWIRQPPGKLEW  
IG VIWGSETTYNSSLKSRVTIISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQ  
GTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG  
VLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAP  
AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM  
KGERRRGKGDGLYQLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 75)

CAR11

40

45

5

10

15

20

25

105976 CAR 11  
полная - nt

atggctctgcccgtgaccgcaactcctcctgccaactggctctgctgcttcacgcccgtcgcccaca  
 agtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgca  
 ccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggga  
 ctggagtggatcggagtgatttggggtagcgaaccacttactataactcttccctgaagtcacg  
 ggtcaccatttcaaaggataaactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccc  
 ctgacaccgcccgtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactac  
 tggggccagggaaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcgg  
 tggaggtggctccggaggtggcggaaagcgaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtccc  
 tttctcccggggaacgggctacccttcttctgctgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaat  
 tggatcaacagaagccgggacagggcccctaggtctcttctaccacacctctcgctgcatag  
 cgggattcccgcacgcttagcgggtctggaagcgggaccgactaactctgaccatctcatctc  
 tccagcccaggacttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggc  
 cagggcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgccccgac  
 catcgctctcagccgcttccctgctcggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgc  
 ataccggggctcttgacttcgctgcatatctacatttgggcccctctggctggtacttgccggg  
 gtctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacat  
 cttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacgctgttcatgccggt  
 tcccagaggaggaggaaggcggctgcaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctcca  
 gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacga  
 cgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccc  
 aagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatg  
 aaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccaggactcagcaccgccaccaa  
 ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg (SEQ ID NO: 76)

30

35

105976  
CAR 11 полная -  
а.к.

MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKG  
 LEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTIISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDY  
 WQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN  
 WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFG  
 QGTKLEIKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCCG  
 VLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP  
 AYKQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM  
 KGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 77)

CAR12

40

105977  
CAR 12 - полная -  
nt

atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgggccga  
 aattgtgatgaccagtcaccgccactcttagccttccaccggtgagcgcgcaaccctgtctt  
 gcagagcctccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcct  
 cgccttctgatctaccacaccagccggtccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcgg

45

5

10

15

20

25

30

35

40

45

	<p>atctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttct                  gtcagcaaggaacaccctgcctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtgga                  ggtggcagcggaggaggtgggtccggcggaggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggacc                  gggctctgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccg                  attacggggtgtcttgatcagacagccaccggggaagggctggaatggattggagtgatttgg                  ggctctgagactacttactacaactcatccctcaagtacgcgctcaccatctcaaaggacaactc                  taagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgactattgcg                  ctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggactctggtcacc                  gtgtccagcaccactacccagcaccgaggccacccaccccgctcctaccatcgcctcccagcc                  tctgtccctgctccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttg                  acttcgctgcgatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggctctgctgctttca                  ctctgctgactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctt                  catgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg                  aaggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggg                  cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcgagagaggagtacgacgtgctggacaagcg                  gagaggacgggaccagaaatggcgggaagccgcgagaaagaatccccagagggcctgtaca                  acgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcaga                  agaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgc                  tcttcacatgcaggccctgccgctcgg (SEQ ID NO: 78)</p>
<p>105977                  CAR 12 - полная -                  а.к.</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSC<u>CRASQDISKYLN</u>WYQQKPGQAP                  RLLIY<u>HTSRLHS</u>GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC<u>QQGNTLPYTF</u>FGQGTKLEIKGG                  GSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLP<u>DYGVSWIRQPPGKLEWIGVIW</u>  <u>GSETTYNSSLKS</u>RVTIISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAK<u>HYYYGGSYAMDY</u>WGQGLVT                  VSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS                  LVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQG                  QNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERR                  RGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 79)</p>
<p>CTL019</p>	
<p>CTL019 полная -                  nt</p>	<p>atggccttaccagtgaccgccttgctcctgcccgtggccttgctgctccacgccgaccaggccgga                  catccagatgacacagactacatcctcctgtctgctctctgggagacagagtaccatcagtt                  gcagggcaagt caggacattagtaaatatttaaatgggtatcagcagaaaccagatggaactgtt                  aaactcctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtg                  gtctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttactttt                  gccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagatcacaggtggc                  ggtggctcggcgggtgggtgggtcgggtggcggcgatctgaggtgaaactgcaggagt caggacc                  tggcctggtggcgcctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattaccgg</p>

5	actatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggctctggagtggtgggagtaaatatgg ggtagtgaaaccacataactataattcagctctcaaactccagactgaccatcatcaaggacaactc caagagccaagttttcttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtg ccaacattattactacggtggttagctatgctatggactactggggccaaggaacctcagtcacc gtctcctcaaccacgacgccagcgccgaccaccaacaccggcgccaccatcgcgctcgagcc cctgtccctgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggcgagtgacacagagggggctgg acttcgctgtgatctacatctggggcgcccttgccgggacttggtgggtccttctcctgtca ctggttatcaccctttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatataattcaacaaccatt 10 tatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaag aaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgctacaagcagggc cagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagag acgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaacctcaggaaggcctgtaca 15 atgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgcgg aggggcaagggcacgatggcctttaccagggctctcagtacagccaccaaggacacctacgacgc ccttcacatgcaggccctgccccctcgc (SEQ ID NO: 80)
20  25	MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyyqqkpdgtv klliyhtsrhsgvpsrfsrgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitgg ggsgggsgggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqprrkglewlgviw gsettyynsalksrhtiikdnksqvflkmnslqtddtaiyycahyygggyamdywgqgtsvt vssttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiywaplagtcgvllls lvitlyckrgrklliyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg qnqlynelnlgrreedyvldkrrrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerr rgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO: 81)

*Ассоциированные с CD19 заболевания и/или нарушения*

В одном аспекте изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли, например, злокачественной опухоли, ассоциированной с экспрессией CD19, посредством  
30 терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками). Иллюстративные злокачественные опухоли включают, но не ограничиваются ими, например, один или несколько острых лейкозов, включая, но не ограничиваясь ими, например, В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз ("В-ALL"), Т-клеточный острый  
35 лимфоцитарный лейкоз ("Т-ALL"), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL); один или несколько хронических лейкозов, включая, но не ограничиваясь ими, например, хронический миелогенный лейкоз (СМL), хронический лимфоцитарный лейкоз (СLЛ). Дополнительные злокачественные опухоли или гематологические состояния, ассоциированные с экспрессией CD19, включают, но не ограничиваются ими, например,  
40 В-клеточный промиелоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток мантийной  
45 зоны (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмабластную лимфому, новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема, и "предлейкоз", который представляет собой многообразную группу гематологических состояний, объединенных

неэффективной продукцией (или дисплазией) миелоидных клеток крови, и т.п. Кроме того, заболевание, ассоциированное с экспрессией CD19, включает, но не ограничиваясь ими, например, атипичные и/или неклассические злокачественные опухоли, новообразования, предзлокачественные состояния или пролиферативные заболевания, ассоциированные с экспрессией CD19.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способам лечения CLL.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способам лечения ALL.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способам лечения В-клеточного ALL.

В одном аспекте изобретение относится к способам лечения отвечающего индивидуума (например, полностью отвечающего и частично отвечающего индивидуума), имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как ALL и CLL) CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетки, НК-клетки), как описано в настоящем описании, например, такими как CTL019). В одном варианте осуществления изобретение относится к способам лечения отвечающего индивидуума (например, полностью отвечающего и частично отвечающего индивидуума) CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) в комбинации с другим лекарственным средством, например, другим лекарственным средством, описанным в настоящем описании (например, другим CAR, например, другим CAR, описанным в настоящем описании, ингибиторный CAR, например, ингибиторным CAR, описанным в настоящем описании, ингибитором киназы (например, ингибитором киназы, описанным в настоящем описании, например, ингибитором mTOR, ингибитором ВТК), ингибитором точки контроля, например, ингибитором точки контроля, описанным в настоящем описании, стандартной терапией и т.п.). Комбинация может представлять собой, например, комбинацию с любым средством, описанным в настоящем описании. В одном варианте осуществления после лечения CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), например, первоначального лечения CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), частично отвечающего индивидуума исследуют любым из способов, описанных в настоящем описании, например, таким как исследование сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток), и, если статус не изменился и/или ухудшился, например, до не отвечающего индивидуума, тогда индивидууму проводят альтернативную терапию, например, стандартную терапию конкретной злокачественной опухоли.

В одном аспекте изобретение относится к способам лечения не отвечающего индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как ALL и CLL) CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками), как описано в настоящем описании, например, такими как CTL019). В одном варианте осуществления изобретение относится к способам лечения не отвечающего индивидуума CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) в комбинации с другим лекарственным средством, например, другим лекарственным средством, описанным в настоящем описании (например, другим CAR, например, другим CAR, описанным в настоящем описании, ингибиторным CAR, например, ингибиторным CAR, описанным в настоящем описании, ингибитором киназы (например, ингибитором киназы, описанным в настоящем описании, например, ингибитором mTOR, ингибитором ВТК), ингибитором точки

контроля, например, ингибитором точки контроля, описанным в настоящем описании, стандартной терапией и т.д.). Комбинация может представлять собой, например, комбинацию с любым средством, описанным в настоящем описании. В одном варианте осуществления после лечения CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), например, первоначального лечения CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), не отвечающего индивидуума исследуют любым из способов, описанных в настоящем описании, например, таким как исследование сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток), и, если статус изменился и/или улучшился, например, до частично отвечающего индивидуума, например, полностью отвечающего индивидуума, тогда индивидууму проводят альтернативную терапию, описанную в настоящем описании.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL или CLL), включающим стадии: (1) идентификации частично отвечающего индивидуума и/или не отвечающего индивидуума, (2) введения частично отвечающему индивидууму и/или не отвечающему индивидууму ингибитора mTOR, описанного в настоящем описании, например, такого как RAD001 и рапамицин, например, в дозе и/или по схеме дозирования, описанной в настоящем описании; и (3) введения CAR (например, CAR против CD19, описанного в настоящем описании, например, такого как CTL019), например, после введения ингибитора mTOR, таким образом, осуществляя лечение злокачественной опухоли. В одном варианте осуществления способ, кроме того, включает введение ингибитора mTOR и/или CAR в комбинации с одним или несколькими ингибиторами точки контроля, описанными в настоящем описании, например, такими как ингибитор PD1.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL или CLL), включающим стадии: (1) идентификации частично отвечающего индивидуума (например, пациента) и/или не отвечающего индивидуума (например, пациента), (2) увеличения в количестве популяции Т-клеток у частично отвечающего индивидуума и/или не отвечающего индивидуума путем селекции популяции менее истощенных и/или более наивных Т-клеток, (3) введения (например, посредством трансформации, трансдукции, инфицирования, электропорации и т.д.) CAR (например, CAR против CD19, описанного в настоящем описании, например, такого как CTL019) в указанную увеличенную в количестве популяцию Т-клеток, таким образом, трансформируя популяцию Т-клеток индивидуума; и (4) введения популяции CAR-экспрессирующих Т-клеток частично отвечающему индивидууму и/или не отвечающему индивидууму, таким образом, осуществляя лечение злокачественной опухоли.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL или CLL), включающим стадии: (1) идентификации частично отвечающего индивидуума (например, пациента) и/или не отвечающего индивидуума (например, пациента), (2) повторной оценки частично отвечающего индивидуума и/или не отвечающего индивидуума (например, пациента) в более поздний период времени в отношении наивных Т-клеток и/или менее истощенного фенотипа, и (3), например, если индивидуум имеет увеличение количества наивных Т-клеток и/или менее истощенный фенотип, проведения терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками)), как описано в настоящем описании, например, такими как

CTL019), таким образом, осуществляя лечение злокачественной опухоли. В одном варианте осуществления более поздний период времени включает по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 3 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 5 часов, по меньшей мере 6 часов, по меньшей мере 7 часов, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 9 часов, по меньшей мере 10 часов, по меньшей мере 11 часов, по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 1 сутки, по меньшей мере 2 суток, по меньшей мере 3 суток, по меньшей мере 4 суток, по меньшей мере 5 суток, по меньшей мере 6 суток, по меньшей мере 1 неделю, по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 3 недели, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 1 год, по меньшей мере 2 года, по меньшей мере 3 года, по меньшей мере 4 года, по меньшей мере 5 лет, по меньшей мере 6 лет, по меньшей мере 7 лет, по меньшей мере 8 лет, по меньшей мере 9 лет, по меньшей мере 10 лет или 11 лет или более.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL или CLL), включающим стадии (1) идентификации частично отвечающих и/или не отвечающих индивидуумов; и (2) лечения альтернативной терапией, например, стандартной терапией конкретной злокачественной опухоли (например, стандартной терапией ALL или CLL). В одном варианте осуществления частично отвечающего индивидуума лечат только стандартной терапией (например, стандартной терапией злокачественной опухоли, такой как ALL или CLL) в отсутствие лечения CAR. В одном варианте осуществления не отвечающего индивидуума лечат только стандартной терапией (например, стандартной терапией гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL или CLL) в отсутствие лечения CAR.

В одном варианте осуществления стандартное лечение CLL включает, но не ограничивается ими, иллюстративные способы терапии, описанные в настоящем описании, например, описанные в таблице А, и их комбинации.

Таблица А: Иллюстративные способы терапии CLL

	Первая линия, $\geq 70$ лет с сопутствующими заболеваниями	Без del (11q) или del (17p)	Del (17p)	Del (11q)
	Обинутузумаб+хлорамбуцил	X	X	X
	Ритуксан+хлорамбуцил	X		X
35	Ритуксан	X		
	Хлорамбуцил	X		
	Флударабин±ритуксан	X	X	
	Кладрибин	X		
	Бендамустин±ритуксан	X		X
	ПЦР (пентостатин, циклофосфамид, ритуксан)	X		X
40	Первая линия, $< 70$ лет без значительных сопутствующих заболеваний			
	FCR (флударабин, циклофосфамид, ритуксан)	X	X	X
	FR (флударабин, ритуксан)	X	X	
	ПЦР	X		X
	Бендамустин±ритуксан	X		X
	Обинутузумаб+хлорамбуцил	X	X	X
45	Вторая линия - рецидивирующие/рефрактерные $\geq 70$ лет			
	Имбрувика	X	X	X
	Сниженная доза FCR	X		X
	Сниженная доза PCRR	X		X
	Бендамустин±ритуксан	X		X

	Офатумумаб	X	X	X
	Алемутузумаб+ритуксан	X	X	X
	Высокая доза метилпреднизона (HDMP)+ритуксимаб	X	X	X
	Леналидомид+ритуксан	X	X	X
5	Ритуксимаб с частым введением дозы	X		X
	Вторая линия - рецидивирующие/рефрактерные < 70 лет без значительных сопутствующих заболеваний			
	Имбрувика	X	X	X
	LCR (флударабин, циклофосфамид, ритуксан)	X		X
	ПЦР	X		X
10	Бендамустин±ритуксан	X		X
	Флударабин+алемтузумаб	X		X
	R-CHOP (ритуксан, циклофосфамид, дозороубин, винкрестин, преднизон)	X	X	X
	Офатумумаб	X	X	X
	OFAR (оксалиплатин, флудара, цитарабин, ритуксан)	X	X	X
	HDMP+ритуксимаб	X	X	X
15	Леналидомид+ритуксан	X	X	X

В одном варианте осуществления стандартная терапия CLL включает (1) лучевую терапию, (2) химиотерапию, (3) хирургическую операцию (например, удаление селезенки), (4) направленную терапию, (5) трансплантацию стволовых клеток или их комбинации. В одном варианте осуществления стандартная терапия включает внешнюю лучевую терапию. В одном варианте осуществления стандартная терапия включает внутреннюю лучевую терапию (например, радиоактивное вещество, запаянное в иглах, проводах и катетерах, например, которые помещают непосредственно в или вблизи злокачественной опухоли).

В одном варианте осуществления стандартная терапия ALL включает, но не ограничивается ими, иллюстративные способы терапии, описанные в настоящем описании, например, описанные в таблице В, и их комбинации.

Таблица В: Иллюстративные способы терапии ALL

	Первая линия
30	RCNOP (ритуксан, циклофосфамид, доксороубин, винкрестин, преднизон)
	RCNOP 14 с частым введением дозы (категория 3)
	ЕРОСН (этопозид, преднизон, винкрестин, циклофосфамид, доксороубин) со скорректированной дозой+ритуксан
	Терапия первой линии для индивидуумов с плохой или очень неустойчивой функцией левого желудочка
	RCEPP (ритуксимаб, циклофосфамид, этопозид, преднизон, прокарбазин)
	RCEOP (ритуксимаб, циклофосфамид, этопозид, винкрестин, преднизон)
35	RCNOP (ритуксимаб, циклофосфамид, митоксантрон, винкрестин, преднизон)
	RCEOP (ритуксимаб, циклофосфамид, этопозид, винкрестин, преднизон)
	ЕРОСН (этопозид, преднизон, винкрестин, циклофосфамид, доксороубин) со скорректированной дозой+ритуксан
	Вторая линия - переход на спасательную терапию высокой дозой аутологичных стволовых клеток
	DHAP (дексаметазон, цисплатин, цитарабин)±ритуксан
	ESHAP (этопозид, метилпреднизолон, цитарабин, цисплатин) ± ритуксан
40	GDP (гемцитабин, дексаметазон, цисплатин)±ритуксан
	GemOx (гемцитабин, оксалиплатин)±ритуксан
	ICE (ифосфамид, карбоплатин, этопозид)+ритуксан
	MINE (месна, ифосфамид, митоксантрон, этопозид)±ритуксан
	Терапия второй линии (не кандидаты для терапии в высокой дозе)
	CEPP (циклофосфамид, этопозид, преднизон, прокарбазин)±ритуксан
45	CEOP (циклофосфамид, этопозид, винкрестин, преднизон)±ритуксан
	DA-EPOСН±ритуксан
	Ревлимид±ритуксан
	Ритуксан
	GemOx±ритуксан



GDP±ритуксан
Бендамустин+ритуксан

В одном варианте осуществления стандартное лечение ALL включает (1) химиотерапию, (2) лучевую терапию, (3) трансплантацию стволовых клеток, (4) биологическую терапию, (5) направленную терапию и их комбинации.

В одном варианте осуществления стандартная терапия включает, но не ограничивается ими, флударабин с циклофосфамидом (FC); флударабин с ритуксимабом (FR); флударабин, циклофосфамид и ритуксимаб (FCR); циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизон (СНОР) и их комбинации. Основные химиотерапевтические средства, предусматриваемые для применения, включают, но не ограничиваются ими, анастрозол (Arimidex®), бикалутамид (Casodex®), блеомицин сульфат (Blenoxane®), бусульфан (Myleran®), бусульфан инъекционный (Busulfex®), капецитабин (Xeloda®), N4-пентоксикарбонил-5-дезоксид-5-фторцитидин, карбоплатин (Paraplatin®), кармустин (BiCNU®), хлорамбуцил (Leukeran®), цисплатин (Platinol®), кладрибин (Leustatin®), циклофосфамид (Cytosan® или Neosar®), цитарабин, цитозин арабинозид (Cytosar-U®), инъекционный липосомальный цитарабин (DepoCyt®), дакарбазин (DTIC-Dome®), дактиномицин (актиномицин D, космоган), даунорубин гидрохлорид (Cerubidine®), инъекционный липосомальный даунорубин цитрат (DaunoXome®), дексаметазон, доцетаксел (Taxotere®), доксорубин гидрохлорид (Adriamycin®, Rubex®), этопозид (Vepesid®), флударабин фосфат (Fludara®), 5-фторурацил (Adrucil®, Efudex®), флутамид (Eulexin®), тезацитибин, гемцитабин (дифтордезоксифторцитидин), гидроксимочевину (Hydrea®), идарубин (Idamycin®), ифосфамид (IFEX®), иринотекан (Camptosar®), L-аспарагиназу (ELSPAR®), лейковорин кальций, мелфалан (Alkeran®), 6-меркаптопурин (Purinethol®), метотрексат (Folex®), митоксантрон (Novantrone®), милотарг, паклитаксел (Taxol®), феникс (иттрий-90/MX-DTPA), пентостатин, имплантат полифепросана 20 с кармустином (Gliadel®), тамоксифен цитрат (Nolvadex®), тенипозид (Vumon®), 6-тиогуанин, тиотепу, тирапазамин (Tirazone®), топотекан гидрохлорид для инъекций (Nucampin®), винбластин (Velban®), винкристин (Oncovin®), и винорелбин (Navelbine®) и их комбинации.

В одном варианте осуществления химиотерапия включает антиметаболит, включающий, но не ограничивающийся ими, антагонисты фолиевой кислоты (также называемые в настоящем описании антифолатами), аналоги пиримидинов, аналоги пуринов и ингибиторы дезаминазы: метотрексат (Rheumatrex®, Trexall®), 5-фторурацил (Adrucil®, Efudex®, Fluoroplex®), флоксуридин (FUDF®), цитарабин (Cytosar-U®, Tarabine PFS), 6-меркаптопурин (Puri-Nethol®), 6-тиогуанин (Thioguanin Tabloid®), флударабин фосфат (Fludara®), пентостатин (Nipent®), пеметрексед (Alimta®), ралтитрексед (Tomudex®), кладрибин (Leustatin®), клофарабин (Clofarex®, Clolar®), цитарабин липосомальный (также известный как липосомальный Ara-C, DepoCyt™); децитабин (Dacogen®); гидроксимочевина (Hydrea®, Droxia™ и Mylocel™); меркаптопурин (Puri-Nethol®), пралатрексед (Foloty™), капецитабин (Xeloda®), неларабин (Arranon®), азациитидин (Vidaza®) и гемцитабин (Gemzar®). Подходящие антиметаболиты включают, например, 5-фторурацил (Adrucil®, Efudex®, Fluoroplex®), флоксуридин (FUDF®), капецитабин (Xeloda®), пеметрексед (Alimta®), ралтитрексед (Tomudex®) и гемцитабин (Gemzar®), и их комбинации. В одном варианте осуществления аналог пурина представляет собой флударабин.

В одном варианте осуществления химиотерапия включает алкилирующее средство, включающее, но не ограничивающееся ими, азотистые иприты, производные

этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевину и триазены: урацил мустард (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethylodopan®, Desmethylodopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil nitrogen mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®), хлорметин (Mustargen®), циклофосфамид (Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™), ифосфамид (Mitoxana®), мелфалан (Alkeran®), хлорамбуцил (Leukeran®), пипоброман (Amedel®, Vercyte®), триэтиленмеламин (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®), триэтилентиофосфорамин, темозоломид (Temodar®), тиотепу (Thioplex®), бусульфан (Busilvex®, Myleran®), кармустин (BiCNU®), ломустин (SeeNU®), стрептозоцин (Zanosar®) и дакарбазин (DTIC-Dome®) и их комбинации. Дополнительные иллюстративные алкилирующие средства включают, но не ограничиваются ими, оксалиплатин (Eloxatin®); темозоломид (Temodar® и Temodal®); дактиномицин (также известный как актиномицин-D, Cosmegen®); мелфалан (также известный как L-ПАМ, L-сарколизин и фенилаланин мустард, Alkeran®); алтретамин (также известный как гексаметилмеламин (НММ), Hexalen®); кармустин (BiCNU®); бендамустин (Treanda®); бусульфан (Busulfex® и Myleran®); карбоплатин (Paraplatin®); ломустин (также известный как CCNU, SeeNU®); цисплатин (также известный как CDDP, Platinol® и Platinol®-AQ); хлорамбуцил (Leukeran®); циклофосфамид (Cytoxan® и Neosar®); дакарбазин (также известный как DTIC, DIC и имидазол карбоксамида, DTIC-Dome®); алтретамин (также известный как гексаметилмеламин (НММ), Hexalen®); ифосфамид (Ifex®); преднумустин; прокарбазин (Matulane®); мехлорэтамин (также известный как азотистый иприт, мустин и мехлорэтамин гидрохлорид, Mustargen®); стрептозоцин (Zanosar®); тиотепу (также известную как тиофосфоамид, TESPА и TSPA, Thioplex®); циклофосфамид (Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®), бендамустин HCl (Treanda®) и их комбинации. В одном варианте осуществления алкилирующее средство представляет собой циклофосфамид.

В одном варианте осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой ингибитор киназы, например, ингибитор тирозинкиназы, включающий, но не ограничивающийся ими, эрлотиниба гидрохлорид (Tarceva®); линифаниб (N-[4-(3-амино-1H-индазол-4-ил)фенил]-N'-(2-фтор-5-метилфенил)мочевина, также известная как АВТ 869, доступная от Genentech); сунитиниба малат (Sutent®); босутиниб (4-[(2,4-дихлор-5-метоксифенил)амино]-6-метокси-7-[3-(4-метилпиперазин-1-ил)пропокси]хинолин-3-карбонитрил, также известный как SKI-606 и описанный в патенте США № 6780996); дасатиниб (Sprycel®); пазопаниб (Votrient®); сорафениб (Nexavar®); зактому (ZD6474); и иматиниб или иматиниба мезилат (Gilevec® и Gleevec®). В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор ВТК, выбранный из ибрутиниба (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774 и LFM-A13. В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, выбранный из алоизина А; флавопиридола или HMR-1275, 2-(2-хлорфенил)-5,7-дигидрокси-8-[(3S,4R)-3-гидрокси-1-метил-4-пиперидинил]-4-хроменон; кризотиниб (PF-02341066; 2-(2-хлорфенил)-5,7-дигидрокси-8-[(2R,3S)-2-(гидроксиметил)-1-метил-3-пирролидинил]-4Н-1-бензопиран-4-она гидрохлорид (P276-00); 1-метил-5-[[2-[5-(трифторметил)-1H-имидазол-2-ил]-4-пиридинил]окси]-А-[4-(трифторметил)фенил]-1H-бензимидазол-2-амин (RAF265); индисулам (E7070); росковитин (CYC202); пальбоциклиб (PD0332991); динациклиб (SCH727965); N-[5-[[5-трет-бутилоксазол-2-ил)метил]тио]тиазол-2-ил]пиперидин-4-карбоксамида (BMS 387032); 4-[[9-хлор-7-(2,6-дифторфенил)-5H-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил]амино]бензойную кислоту (MLN8054); 5-[3-(4,6-дифтор-1H-бензимидазол-2-ил)-1H-индазол-5-ил]-N-этил-

4-метил-3-пиридинметанами́н (AG-024322); 4-(2,6-дихлорбензоиламино)-1H-пиразол-3-карбоновой кислоты N-(пиперидин-4-ил)амид (AT7519); 4-[2-метил-1-(1-метилэтил)-1H-имидазол-5-ил]-N-[4-(метилсульфонил)фенил]-2-пиримидинами́н (AZD5438); и XL281 (BMS908662). В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор MNK, выбранный из CGP052088; 4-амино-3-(п-фторфениламино)пиразоло [3,4-d]пиримидин (CGP57380); церкоспорами́д; ETC-1780445-2 и 4-амино-5-(4-фторанилино)пиразоло[3,4-d]пиримидин.

В одном варианте осуществления направленная терапия включает, но не ограничивается ими, антитело против CD20 или его функциональный фрагмент, например, такой как ритуксимаб (Rituxan® и MabThera®); тозитумомаб (Bexxar®); и офатумумаб (Arzerra®) и их комбинации. В одном варианте осуществления направленная терапия включает, но не ограничивается ими, антитело против CD52 или его функциональный фрагмент, например, такое как алемтузумаб (Campath®).

В одном варианте осуществления биологическая терапия включает иммунотерапию. Иллюстративные антрациклины включают, но не ограничиваются ими, доксорубицин (Adriamycin® и Rubex®); блеомицин (Ienoxane®); даунорубицин (даунорубицина гидрохлорид, дауномицин и рубидомицина гидрохлорид, Cerubidine®); даунорубицин липосомальный (липосомы даунорубицина цитрата, DaunoXome®); митоксантрон (DHAD, Novantrone®); эпирубицин (Ellence™); идарубицин (Idamycin®, Idamycin PFS®); митомицин С (Mutamycin®); гелданамицин; гербимицин; равидомицин; дезацетилравидомицин и их комбинации.

В одном варианте осуществления трансплантация стволовых клеток включает трансплантацию аутогенных стволовых клеток. В одном варианте осуществления трансплантация стволовых клеток включает трансплантацию аллогенных стволовых клеток. В одном варианте осуществления трансплантация стволовых клеток включает аллогенную трансплантацию костного мозга. В одном варианте осуществления трансплантация стволовых клеток включает трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). В одном варианте осуществления гемопоэтические стволовые клетки происходят из различных тканей, включая, но не ограничиваясь ими, костный мозг, периферическую кровь, пуповинную кровь и их комбинации.

В одном варианте осуществления предусматриваемые способы включают определение того, идентифицируется ли индивидуум как имеющий статистически значимое отличие в уровне экспрессии одного или нескольких маркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15 и таблице 16, или биомаркера PD-1, биомаркера LAG-3, биомаркера TIM-3, биомаркера CD57, биомаркера CD27, биомаркера CD122, биомаркера CD62L и биомаркера KLRG1, относительно эталонного уровня, и введение индивидууму терапевтически эффективной дозы CAR-экспрессирующей клетки, например, Т-клетки или НК-клетки. В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующая клетка (например, Т-клетка, НК-клетка) представляет собой клетку, экспрессирующую CAR против CD19 (например, Т-клетку, НК-клетку), описанную в настоящем описании, например, такую как CTL019.

В одном аспекте изобретение относится к способам лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией CD19. В одном аспекте изобретение относится к способам лечения заболевания, где часть опухоли является отрицательной по CD19 и часть опухоли является положительной по CD19. Например, предусматриваемые способы являются пригодными для лечения индивидуумов, которым проводили терапию заболевания, ассоциированного с повышенной экспрессией CD19, где индивидуум,

которому проводили лечение против повышенных уровней CD19, демонстрирует заболевание, ассоциированное с повышенными уровнями CD19.

В одном аспекте предусматриваемые способы включают вектор, содержащий CAR против CD19, функционально связанный с промотором, для экспрессии в клетках млекопитающих (например, Т-клетках или НК-клетках). В одном аспекте предусматриваемые способы включают рекомбинантную клетку (например, Т-клетку или НК-клетку), экспрессирующую CAR против CD19, для применения для лечения опухолей, экспрессирующих CD19, где рекомбинантную Т-клетку, экспрессирующую CAR против CD19, называют клеткой, экспрессирующей CAR против CD19. В одном аспекте клетка, экспрессирующая CAR против CD19 (например, Т-клетка, НК-клетка), вводимая согласно описанным способам, способна приводить в контакт опухолевую клетку по меньшей мере с одним CAR против CD19, экспрессируемым на ее поверхности, так что CAR-экспрессирующая клетка нацеливается на опухолевую клетку и происходит ингибирование роста опухоли.

В одном аспекте изобретение относится к способу ингибирования роста опухолевой клетки, экспрессирующей CD19, включающему приведение в контакт опухолевой клетки с клеткой, экспрессирующей CAR против CD19 (например, Т-клеткой, НК-клеткой), описанной в настоящем описании, так что CAR-экспрессирующая клетка активируется в ответ на антиген и нацеливается на злокачественную опухоль, где происходит ингибирование роста опухоли.

В одном аспекте изобретение относится к типу клеточной терапии, где Т-клетки генетически модифицированы для экспрессии CAR и CAR-экспрессирующую клетку (например, Т-клетку, НК-клетку) вводят путем инфузии реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенная путем инфузии клетка способна уничтожать опухолевые клетки реципиента. В отличие от антительной терапии, модифицированные посредством CAR клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) способны реплицироваться *in vivo*, что приводит к длительной персистенции, которая может приводить к длительному контролю опухоли. В различных аспектах клетки, вводимые пациенту, или их потомство, персистируют у пациента в течение по меньшей мере четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев, тринадцати месяцев, четырнадцати месяцев, пятнадцати месяцев, шестнадцати месяцев, семнадцати месяцев, восемнадцати месяцев, девятнадцати месяцев, двадцати месяцев, двадцати одного месяца, двадцати двух месяцев, двадцати трех месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет после введения клетки пациенту.

Также изобретение относится к типу клеточной терапии, где клетки (например, Т-клетки, НК-клетки) модифицированы, например, транскрибированной *in vitro* РНК, для временной экспрессии химерного рецептора антигена (CAR), и CAR-экспрессирующую клетку (например, Т-клетку, НК-клетку) вводят путем инфузии реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенная путем инфузии клетка способна уничтожать опухолевые клетки реципиента. Таким образом, в различных аспектах клетки, введенные пациенту, сохраняются в течение менее чем одного месяца, например, трех недель, двух недель, одной недели после введения клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) пациенту.

Без связи с какой-либо конкретной теорией, иммунный ответ против опухолевых клеток, индуцируемый модифицированными посредством CAR клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), может представлять собой активный или пассивный иммунный ответ или альтернативно может быть следствием прямого относительно

непрямого иммунного ответа. В одном аспекте трансдуцированные CAR T-клетки проявляют специфическую секрецию провоспалительных цитокинов и мощную цитолитическую активность в ответ на злокачественные клетки человека, экспрессирующие CD19, выдерживают ингибирование растворимым CD19 и опосредуют неспецифический цитолиз и опосредуют регрессию развернутой опухоли человека. Например, опухолевые клетки без антигена в гетерогенной области экспрессирующей CD19 опухоли могут быть чувствительными к непрямому разрушению перенацеленных на CD19 T-клеток, которые ранее реагировали с соседними положительными по антигену злокачественными клетками.

В одном аспекте полностью человеческие модифицированные посредством CAR клетки (например, T-клетки, НК-клетки), описанные в настоящем описании, могут представлять собой тип вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или терапии *in vivo* у млекопитающего. В одном аспекте млекопитающим является человек.

Что касается иммунизации *ex vivo*, по меньшей мере одно из следующих событий происходит *in vitro* перед введением клетки в млекопитающего: i) увеличение клеток в количестве, ii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в клетки или iii) криоконсервация клеток.

Методики *ex vivo* хорошо известны в данной области и более подробно рассмотрены ниже. В кратком изложении, выделяют клетки индивидуума (например, человека) и генетически модифицируют (т.е. трансдуцируют или трансфицируют *in vitro*) вектором, экспрессирующим CAR, описанный в настоящем описании. Модифицированную посредством CAR клетку можно вводить реципиенту-млекопитающему для обеспечения терапевтической пользы. Реципиент-млекопитающее может представлять собой человека и модифицированная посредством CAR клетка может быть аутологичной для реципиента. Альтернативно клетки могут быть аллогенными, сингенными или ксеногенными в отношении реципиента.

#### *Гематологическая злокачественная опухоль*

Гематологические злокачественные состояния представляют собой типы злокачественной опухоли, такие как лейкоз, лимфома и злокачественные лимфоролиферативные состояния, которые поражают кровь, костный мозг и лимфатическую систему.

Лейкоз можно подразделить на острый лейкоз и хронический лейкоз. Острый лейкоз можно далее подразделить на острый миелогенный лейкоз (AML) и острый лимфоидный лейкоз (ALL). Хронический лейкоз включает хронический миелогенный лейкоз (CML) и хронический лимфоидный лейкоз (CLL). Другие родственные состояния включают миелодиспластические синдромы (MDS, ранее известный как "предлейкоз"), которые представляют собой многообразную совокупность гематологических состояний, объединенных неэффективной продукцией (или дисплазией) миелоидных клеток крови и риском трансформации в AML.

Лимфома представляет собой группу опухолей из клеток крови, которая развивается из лимфоцитов. Иллюстративные лимфомы включают неходжкинскую лимфому и лимфому Ходжкина.

Настоящее изобретение относится к композициям и способам для лечения злокачественной опухоли. В одном аспекте злокачественная опухоль представляет собой гематологическую злокачественную опухоль, включая, но не ограничиваясь ими, лейкоз или лимфому. В одном аспекте CAR-экспрессирующие клетки (например, T-клетки, НК-клетки) по изобретению можно использовать для лечения злокачественных опухолей и новообразований, таких как, но не ограничиваясь ими, острые

лейкозы, включая, но не ограничиваясь ими, например, В-клеточный острый лимфоидный лейкоз ("B-ALL"), Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз ("T-ALL"), острый лимфоидный лейкоз (ALL); один или несколько хронических лейкозов, включая, но не ограничиваясь ими, например, хронический миелогенный лейкоз (CML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); дополнительные гематологические злокачественные опухоли или гематологические состояния, включая, но не ограничиваясь ими, например, В-клеточный промиелоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмабластную лимфому, новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема, и "предлейкоз", который представляет собой многообразный набор гематологических состояний, объединенных неэффективной продукцией (или дисплазией) миелоидных клеток крови и т.п. Кроме того, заболевание, ассоциированное с экспрессией CD19, включает, но не ограничивается ими, например, атипичные и/или неклассические злокачественные опухоли, новообразования, предзлокачественные состояния или пролиферативные заболевания, экспрессирующие CD19.

Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования пролиферации или снижения популяции CD19-экспрессирующих клеток, причем способы включают приведение в контакт популяции клеток, содержащей CD19-экспрессирующую клетку, с клеткой, экспрессирующей CAR против CD19 (например, Т-клеткой, НК-клеткой), описанной в настоящем описании, которая связывается с CD19-экспрессирующей клеткой. В конкретном аспекте изобретение относится к способам ингибирования пролиферации или уменьшения популяции злокачественных клеток, экспрессирующих CD19, причем способы включают приведение в контакт популяции CD19-экспрессирующих злокачественных клеток с клеткой, экспрессирующей CAR против CD19 (например, Т-клеткой, НК-клеткой), описанной в настоящем описании, которая связывается с CD19-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования пролиферации или уменьшения популяции злокачественных клеток, экспрессирующих CD19, причем способы включают приведение в контакт популяции CD19-экспрессирующих злокачественных клеток с клеткой, экспрессирующей CAR против CD19 (например, Т-клеткой, НК-клеткой), описанной в настоящем описании, которая связывается с CD19-экспрессирующей клеткой. В определенных аспектах клетка, экспрессирующая CAR против CD19 (например, Т-клетка, НК-клетка) снижает количество, уровень, величину или процент клеток и/или злокачественных клеток по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 99% у индивидуума с миелоидным лейкозом или другой злокачественной опухолью или другой злокачественной опухолью, ассоциированной с CD19-экспрессирующими клетками, или в модели на животных для этих заболеваний, относительно отрицательного контроля. В одном аспекте индивидуумом является человек.

Настоящее изобретение также относится к способам предупреждения, лечения и/или управления течением заболевания, ассоциированного с CD19-экспрессирующими

клетками (например, гематологической злокачественной опухоли или атипичной злокачественной опухоли, экспрессирующей CD19), причем способы включают введение индивидууму, нуждающемуся в этом, CAR-экспрессирующей клетки (например, Т-клетки, НК-клетки), описанной в настоящем описании, которая связывается с CD19-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте индивидуумом является человек. Неограничивающие примеры нарушений, ассоциированных с CD19-экспрессирующими клетками, включают аутоиммунные нарушения (такие как волчанка), воспалительные нарушения (такие как аллергия и астма) и злокачественные опухоли (такие как гематологические злокачественные опухоли или атипичные злокачественные опухоли, экспрессирующие CD19).

Настоящее изобретение также относится к способам предупреждения, лечения и/или управления течением заболевания, ассоциированного с CD19-экспрессирующими клетками, причем способы включают введение индивидууму, нуждающемуся в этом, клетки, экспрессирующей CAR против CD19 (например, Т-клетки, НК-клетки), описанной в настоящем описании, которая связывается с CD19-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте индивидуумом является человек.

Настоящее изобретение относится к способам предупреждения рецидива злокачественной опухоли, ассоциированной с CD19-экспрессирующими клетками (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL), причем способы включают введение индивидууму, нуждающемуся в этом, клетки, экспрессирующей CAR против CD19 (например, Т-клетки, НК-клетки), описанной в настоящем описании, которая связывается с CD19-экспрессирующей клеткой. В одном аспекте способы включают введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток), описанных в настоящем описании, которые связываются с CD19-экспрессирующей клеткой, в комбинации с эффективным количеством другого терапевтического средства.

#### *Комбинированная терапия*

Будет понятно, что любую терапию злокачественной опухоли, как описано выше и здесь, можно проводить в комбинации с одним или несколькими дополнительными способами терапии для лечения и/или снижения симптомов злокачественной опухоли, описанной в настоящем описании. Фармацевтические композиции можно вводить одновременно с, до или после одного или нескольких других дополнительных способов терапии или лекарственных средств. В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, можно использовать в комбинации с другими известными средствами и способами терапии. Введение "в комбинации", как используют в рамках изобретения, означает, что два (или более) различных способа лечения осуществляют у индивидуума в процессе наличия у индивидуума нарушения, например, два или более способа лечения проводят после диагностирования у пациента нарушения и пока не произойдет излечение или устранение нарушения, или пока лечение не прекратят по другим причинам. В некоторых вариантах осуществления введение одного лекарственного средства все еще проводят, когда начинается введение второго, так что существует перекрытие с точки зрения введения. Это иногда называют в настоящем описании "одновременной" или "совместной" доставкой. В других вариантах осуществления доставка одного лекарственного средства заканчивается до начала доставки другого лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления в любом случае лечение является более эффективным вследствие комбинированного введения. Например, второе лекарственное средство

является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдают при использовании меньшего количества второго лекарственного средства, или второе лекарственное средство снижает симптомы в большей степени, чем наблюдалось бы, если бы второе лекарственное средство вводили в отсутствие первого лекарственного средства, или аналогичную ситуацию наблюдают для первого лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления доставка является такой, что снижение симптома или другого параметра, связанного с нарушением, является более высоким, чем наблюдалось бы при доставке одного лекарственного средства в отсутствие другого. Эффект двух способов лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или более чем аддитивным. Доставка может быть такой, что эффект первого доставляемого лекарственного средства все еще поддается обнаружению, когда доставляют второе лекарственное средство.

CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, и по меньшей мере одно дополнительное лекарственное средство можно вводить одновременно, в одной или в отдельных композициях, или последовательно. В случае последовательного введения сначала можно вводить CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, а затем можно вводить дополнительное средство, или порядок введения может быть обратным.

Терапию CAR и/или введение других лекарственных средств, проведение процедур и способов, можно осуществлять в периоды активного нарушения или в период ремиссии или менее активного заболевания. Терапию CAR можно проводить до другого лечения, одновременно с другим лечением, после лечения или в ходе ремиссии нарушения.

При введении в комбинации терапию CAR и дополнительное средство (например, второе или третье средство), или все их них, можно вводить в количестве или дозировке, превышающей, являющейся более низкой или такой же, как и количество или дозировка каждого средства, используемого индивидуально, например, в качестве монотерапии. В определенных вариантах осуществления введенное количество или дозировка терапии CAR, дополнительного средства (например, второго или третьего средства), или всех из них, являются более низкими (например, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50%), чем количество или дозировка каждого средства, используемого индивидуально, например, в качестве монотерапии. В других вариантах осуществления количество или дозировка терапии CAR, дополнительного средства (например, второго или третьего средства), или всех из них, которые приводят к желаемому эффекту (например, лечение злокачественной опухоли), являются более низкими (например, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50% более низкой), чем количество или дозировка каждого средства, используемого индивидуально, например, в качестве монотерапии, требуемые для достижения того же терапевтического эффекта.

В следующих аспектах экспрессирующую CAR клетку, описанную в настоящем описании, можно использовать в терапевтическом режиме в комбинации с хирургической операцией, химиотерапией, лучевой терапией, иммунодепрессивными средствами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антителами или другими иммунодеструктивными средствами, такими как CAMPATH, антитела против CD3, или другими способами терапии на основы антител, цитоксином, флударабином, циклоспорином, FK506, рапамицином, микофеноловой кислотой, стероидами, FR901228, цитокинами и лучевой терапией, пептидной вакциной, такой как пептидная вакцина, описанная в Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971.

В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную в



настоящем описании, можно использовать в комбинации с химиотерапевтическим средством. Иллюстративные химиотерапевтические средства включают средства, описанные в абзацах 873-874 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, и их комбинации.

Иллюстративные алкилирующие средства включают, но не ограничиваются ими, средства, описанные в абзаце 875 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, и их комбинации.

Иллюстративные ингибиторы mTOR включают, но не ограничиваются ими, RAD001, темсиролимус; ридафоролимус (ранее известный как деферолимус, (1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2-[(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*,23*S*,24*E*,26*E*,28*Z*,30*S*,32*S*,35*R*)-1,18-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30,3,1,0<sup>4,9</sup>]-гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексилдиметилфосфинат, также известный как AP23573 и MK8669, и описанный в публикации РСТ № WO 03/064383); эверолимус (Afinitor® или RAD001); рапамицин (AY22989, Sirolimus®); симапимод (CAS 164301-51-3); эмсиролимус, (5-{2,4-бис[(3*S*)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-*d*]пиримидин-7-ил}-2-метоксифенил)метанол (AZD8055); 2-амино-8-[транс-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метилпиридо[2,3-*d*]пиримидин-7(8*H*)-он (PF04691502, CAS 1013101-36-4) и N<sup>2</sup>-[1,4-диоксо-4-[[4-(4-оксо-8-фенил-4*H*-1-бензопиран-2-ил)морфолиний-4-ил]метокси]бутил]-L-аргинилглицил-L-α-аспартил-L-серин, внутренняя соль (SF1126, CAS 936487-67-1), XL765 и их комбинации.

Иллюстративные иммуномодуляторы включают, но не ограничиваются ими, иммуномодуляторы, описанные в абзаце 882 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, и их комбинации.

Иллюстративные антрациклины включают, но не ограничиваются ими, антрациклины, описанные в абзаце 883 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, и их комбинации.

Иллюстративные алкалоиды барвинка включают, но не ограничиваются ими, алкалоиды барвинка, описанные в абзаце 884 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, и их комбинации.

Иллюстративные ингибиторы протеасом включают, но не ограничиваются ими, ингибиторы протеасом, описанные в абзаце 884 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, и из комбинации.

В некоторых вариантах осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят в комбинации с онколитическим вирусом. В некоторых вариантах осуществления онколитические вирусы способны селективно реплицироваться в злокачественных клетках и запускать гибель или замедлять рост злокачественных клеток. В некоторых случаях, онколитические вирусы не имеют эффекта или имеют минимальный эффект на незлокачественные клетки. Онколитический вирус включает, но не ограничивается ими, онколитический аденовирус, онколитические вирусы простого герпеса, онколитический ретровирус, онколитический парвовирус, онколитический вирус коровьей оспы, онколитический вирус Синбис, онколитический вирус гриппа или

онколитический РНК-вирус (например, онколитический реовирус, онколитический вирус болезни Ньюкасла (NDV), онколитический вирус кори или онколитический вирус везикулярного стоматита (VSV)).

5 В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие CAR, описанные в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с молекулой, которая снижает популяцию клеток T<sub>REG</sub>. Способы снижения уровня клеток T<sub>REG</sub> известны в данной области и включают, например, истощение CD25, введение циклофосамида, модулирование функции GITR. Без связи с теорией, полагают, что уменьшение количества клеток T<sub>REG</sub> у индивидуума до афереза или до введения CAR-  
10 экспрессирующих клеток, описанных в настоящем описании, уменьшает количество нежелательных иммунных клеток (например, T<sub>REG</sub>) в микроокружении опухоли и снижает риск рецидива у индивидуума.

15 В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с молекулой, нацеленной на GITR и/или модулирующей функции GITR, такой как агонист GITR и/или антитело против GITR, которые истощают регуляторные T-клетки (T<sub>REG</sub>). В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, описанный в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с циклофосамидом. В одном варианте  
20 осуществления молекулы, связывающие GITR, и/или молекулы, модулирующие функции GITR (например, агонист GITR и/или истощающие T<sub>REG</sub> антитела против GITR), вводят до введения CAR-экспрессирующей клетки. Например, в одном варианте осуществления агонист GITR можно вводить до афереза клеток. В некоторых вариантах осуществления циклофосамид вводят индивидууму до введения (например, инфузии или реинфузии)  
25 CAR-экспрессирующей клетки или до афереза клеток. В некоторых вариантах осуществления циклофосамид и антитело против GITR вводят индивидууму до введения (например, инфузии или реинфузии) CAR-экспрессирующей клетки или до афереза клеток. В одном варианте осуществления индивидуум имеет злокачественную опухоль (например, солидную злокачественную опухоль или гематологическую злокачественную  
30 опухоль, такую как ALL или CLL). В одном варианте осуществления индивидуум имеет CLL. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет ALL. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет солидную злокачественную опухоль, например, солидную злокачественную опухоль, описанную в настоящем описании. Иллюстративные агонисты GITR включают, но не ограничиваются ими, слитые белки  
35 GITR и антитела против GITR (например, двухвалентные антитела против GITR) например, такие как слитый белок GITR, описанный в патенте США № 6111090, патенте Европы № 090505B1, патенте США № 8586023, публикации PCT № WO 2010/003118 и 2011/090754, или антитело против GITR, описанное, например, в патенте США № 7025962, патенте Европы № 1947183B1, патенте США № 7812135, патенте США №  
40 8388967, патенте США № 8591886, патенте Европы № EP 1866339, публикации PCT № WO 2011/028683, публикации PCT № WO 2013/039954, публикации PCT № WO2005/007190, публикации PCT № WO 2007/133822, публикации PCT № WO2005/055808, публикации PCT № WO 99/40196, публикации PCT № WO 2001/03720, публикации PCT № WO99/20758, публикации PCT № WO2006/083289, публикации PCT № WO 2005/115451,  
45 патенте США № 7618632 и публикации PCT № WO 2011/051726.

В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, например, такую как клетка, экспрессирующая CAR против CD19, (например, T-клетку, NK-клетку), например CTL019, вводят индивидууму, например,

индивидууму, идентифицированному как частично отвечающий или не отвечающий индивидуум, в комбинации с агонистом G1TR, например, агонистом G1TR, описанным в настоящем описании. В одном варианте осуществления агонист G1TR вводят до введения CAR-экспрессирующей клетки. Например, в одном варианте осуществления агонист G1TR можно вводить до афереза клеток. В одном варианте осуществления индивидуум имеет злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как ALL и CLL). В одном варианте осуществления индивидуум имеет ALL. В одном варианте осуществления индивидуум имеет CLL.

В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, например, такую как клетка, экспрессирующая CAR против CD19, (например, Т-клетку, НК-клетку), например CTL019, вводят индивидууму, например, индивидууму, идентифицированному как частично отвечающий или не отвечающий индивидуум, в комбинации с ингибитором mTOR, например, ингибитором mTOR, описанным в настоящем описании, например, ингибитором каскада передачи сигнала, являющегося мишенью рапамицина, таким как RAD001. В одном варианте осуществления ингибитор mTOR вводят до CAR-экспрессирующей клетки. Например, в одном варианте осуществления ингибитор mTOR можно вводить до афереза клеток. В одном варианте осуществления индивидуум имеет злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как ALL и CLL). В одном варианте осуществления индивидуум имеет ALL. В одном варианте осуществления индивидуум имеет CLL.

#### *Ингибитор киназы*

В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем описании, можно использовать в режиме лечения в комбинации с ингибитором киназы, например, ингибитором CDK4, ингибитором ВТК, ингибитором MNK, ингибитором mTOR, ингибитором ИТК, и т.д. В одном варианте осуществления индивидуум является полностью отвечающим индивидуумом и индивидууму проводят режим лечения, который включает введение CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании, в комбинации с ингибитором киназы, например, ингибитором киназы, описанным в настоящем описании, например, в дозе или по схеме дозирования, описанным в настоящем описании. В одном варианте осуществления индивидуум является частично отвечающим или не отвечающим, и индивидууму проводят терапевтический режим, который включает введение CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании, в комбинации с ингибитором киназы, например, ингибитором киназы, описанным в настоящем описании, например, в дозе или по схеме дозирования, описанным в настоящем описании.

В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, например, ингибитор CDK4, описанный в настоящем описании, например, ингибитор CDK4/6, например, такой как 6-ацетил-8-циклопентил-5-метил-2-(5-пиперазин-1-илпиридин-2-иламино)-8H-пиридо[2,3-d]пиримидин-7-она гидрохлорид (также называемый палбоциклибом или PD0332991). В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор ВТК, например, ингибитор ВТК, описанный в настоящем описании, например, такой как ибрутиниб. В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, например, ингибитор mTOR, описанный в настоящем описании, например, такой как рапамицин, аналог рапамицина, OSI-027. Ингибитор mTOR может представлять собой, например, ингибитор mTORC1 и/или ингибитор mTORC2, например, ингибитор mTORC1 и/или ингибитор mTORC2, описанный в настоящем описании. В одном варианте осуществления

ингибитор киназы представляет собой ингибитор MNK, например, ингибитор MNK, описанный в настоящем описании, например, такой как 4-амино-5-(4-фторанилино)пиразоло[3,4-*d*]пиримидин. Ингибитор MNK может представлять собой, например, ингибитор MNK1a, MNK1b, MNK2a и/или MNK2b.

5 В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, выбранный из алоизина А; флавопиридола или HMR-1275, 2-(2-хлорфенил)-5,7-дигидрокси-8-[(3*S*,4*R*)-3-гидрокси-1-метил-4-пиперидинил]-4-хроменона; кризотиниба (PF-02341066); 2-(2-хлорфенил)-5,7-дигидрокси-8-[(2*R*,3*S*)-2-(гидроксиметил)-1-метил-3-пирролидинил]-4*H*-1-бензопиран-4-она гидрохлорида (P276-00); 1-метил-5-[[2-[5-  
10 (трифторметил)-1*H*-имидазол-2-ил]-4-пиридинил]окси]-*N*-[4-(трифторметил)фенил]-1*H*-бензимидазол-2-амин (RAF265); индисулама (E7070); росковитина (CYC202); палбоциклиба (PD0332991); динациклиба (SCH727965); *N*-[5-[[5-трет-бутилоксазол-2-ил)метил]тио]гиазол-2-ил]пиперидин-4-карбоксамид (BMS 387032); 4-[[9-хлор-7-(2,6-дифторфенил)-5*H*-пиримидо[5,4-*d*][2]бензазепин-2-ил]амино]бензойной кислоты  
15 (MLN8054); 5-[3-(4,6-дифтор-1*H*-бензимидазол-2-ил)-1*H*-индазол-5-ил]-*N*-этил-4-метил-3-пиридинметанамина (AG-024322); 4-(2,6-дихлорбензоиламино)-1*H*-пиразол-3-карбоновой кислоты *N*-(пиперидин-4-ил)амида (AT7519); 4-[2-метил-1-(1-метилэтил)-1*H*-имидазол-5-ил]-*N*-[4-(метилсульфонил)фенил]-2-пиримидинамина (AZD5438) и XL281 (BMS908662).

20 В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, например, палбоциклиб (PD0332991), и палбоциклиб вводят в дозе приблизительно 50 мг, 60 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 105 мг, 110 мг, 115 мг, 120 мг, 125 мг, 130 мг, 135 мг (например, 75 мг, 100 мг или 125 мг) каждые сутки в течение периода времени, например, каждые сутки в течение 14-21 суток курса из 28 суток, или каждые сутки в  
25 течение 7-12 суток курса из 21 суток. В одном варианте осуществления проводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более курсов введения палбоциклиба.

В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор ВТК, выбранный из ибрутиниба (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774 и LFM-A13.

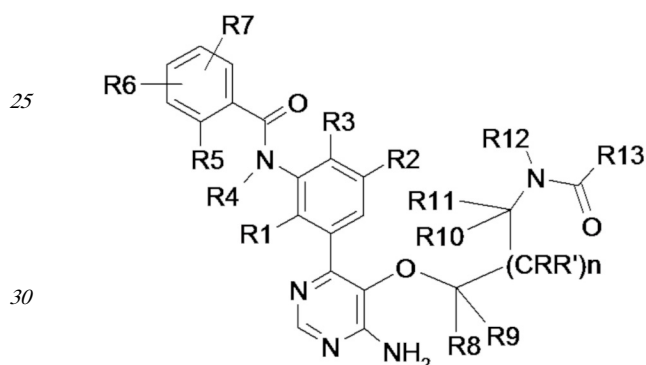
30 В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор ВТК, например, ибрутиниб (PCI-32765), и ибрутиниб вводят в дозе приблизительно 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 420 мг, 440 мг, 460 мг, 480 мг, 500 мг, 520 мг, 540 мг, 560 мг, 580 мг, 600 мг (например, 250 мг, 420 мг или 560 мг) каждые сутки в течение периода времени, например, каждые сутки в течение курса из 21 суток или каждые сутки в течение  
35 курса из 28 суток. В одном варианте осуществления проводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более курсов введения ибрутиниба.

В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, выбранный из темсиролимуса; рифафоролимуса (1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2  
40 [(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*, 23*S*,24*E*,26*E*,28*Z*,30*S*,32*S*,35*R*)-1,18-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23, 29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30,3,1,0<sup>4,9</sup>]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексилдиметилфосфината, также известного как AP23573 и MK8669; эверолимуса (RAD001); рапамицина (AY22989); семапимода; (5-{2,4-бис[(3*S*)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-*d*]пиримидин-7-ил}-2-метоксифенил)метанола  
45 (AZD8055); 2-амино-8-[транс-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метил-пиридо[2,3-*d*]пиримидин-7(8*H*)-она (PF04691502); и *N*<sup>2</sup>-[1,4-диоксо-4-[[4-(4-оксо-8-фенил-4*H*-1-бензопиран-2-ил)морфолиний-4-ил]метокси]бутил]-*L*-аргинилглицил-*L*- $\alpha$ -аспартил-*L*-серина, внутренней соли (SF1126) и XL765.

В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, например рапамицин, и рапамицин вводят в дозе приблизительно 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг (например, 6 мг) каждые сутки в течение периода времени, например, каждые сутки в течение курса из 21 суток или каждые сутки в течение курса из 28 суток. В одном варианте осуществления проводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более курсов введения рапамицина. В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, например, эверолимус, и эверолимус вводят в дозе приблизительно 2 мг, 2,5 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг, 11 мг, 12 мг, 13 мг, 14 мг, 15 мг (например, 10 мг) каждые сутки в течение периода времени, например, каждые сутки в течение курса из 28 суток. В одном варианте осуществления проводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более курсов введения эверолимуса.

В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор MNK, выбранный из CGP052088; 4-амино-3-(п-фторфениламино)пиразоло [3,4-*d*]пиримидина (CGP57380); церкоспорамида; ETC-1780445-2 и 4-амино-5-(4-фторанилино)пиразоло[3,4-*d*]пиримидина.

В некоторых вариантах осуществления способов, применений и композиций, описанных в настоящем описании, ингибитор ВТК представляет собой ингибитор ВТК, описанный в международной заявке WO/2015/079417, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Например, в некоторых вариантах осуществления ингибитор ВТК представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль;



R1 представляет собой водород, C1-C6 алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой;  
 R2 представляет собой водород или галоген;  
 R3 представляет собой водород или галоген;  
 R4 представляет собой водород;  
 R5 представляет собой водород или галоген;  
 или R4 и R5 связаны друг с другом и обозначают связь, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-; -CH<sub>2</sub>-CH=CH- или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-;

R6 и R7 обозначают независимо друг от друга H, C1-C6 алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой, C3-C6 циклоалкил, необязательно замещенный галогеном или гидроксильной группой, или галоген;

R8, R9, R, R', R10 и R11 независимо друг от друга обозначают H, или C1-C6 алкил, необязательно замещенный C1-C6 алкокси; или любые два из R8, R9, R, R', R10 и R11 вместе с атомом углерода, с которым они связаны, могут образовывать 3-6-членное насыщенное карбоциклическое кольцо;

R12 представляет собой водород или C1-C6 алкил, необязательно замещенный галогеном или C1-C6 алкокси;

или R12 и любой из R8, R9, R, R', R10 или R11 вместе с атомами, с которыми они связаны, могут образовывать 4, 5, 6 или 7-членное азацyclicкое кольцо, которое может быть необязательно замещено галогеном, циано, гидроксилом, C1-C6 алкилом или C1-C6 алкокси;

5 n равен 0 или 1; и

R13 представляет собой C2-C6 алкенил, необязательно замещенный C1-C6 алкилом, C1-C6 алкокси или N,N-ди-C1-C6 алкиламино; C2-C6 алкинил, необязательно замещенный C1-C6 алкилом или C1-C6 алкокси; или C2-C6 алкиленилоксид, необязательно замещенный C1-C6 алкилом.

10 *Низкая усиливающая иммунитет доза ингибитора TOR*

В способах, описанных в настоящем описании, можно использовать низкую усиливающую иммунитет дозу ингибитора mTOR, например, аллостерического ингибитора mTOR, включая рапалоги, такие как RAD001. Введение низкой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR (например, дозы, которая является недостаточной для полного подавления иммунной системы, но является достаточной для улучшения иммунной функции) может оптимизировать эффективность иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или CAR-экспрессирующих клеток, у индивидуума. Способы измерения ингибирования mTOR, дозировки, режимы лечения и подходящие фармацевтические композиции описаны в патентной заявке США № 2015/0140036, поданной 13 ноября 2014 года, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

В одном варианте осуществления введение низкой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR может приводить к одному или нескольким из следующих:

- i) уменьшение количества положительных по PD-1 иммунных эффекторных клеток;
- ii) увеличение количества отрицательных по PD-1 иммунных эффекторных клеток;
- iii) увеличение соотношения отрицательные по PD-1 иммунные эффекторные клетки/положительные по PD-1 иммунные эффекторные клетки;
- iv) увеличение количества наивных Т-клеток;

v) увеличение экспрессии одного или нескольких из следующих маркеров: CD62L<sup>high</sup>, CD127<sup>high</sup>, CD27 и BCL2, например, на Т-клетках памяти, например, предшественниках Т-клеток памяти;

vi) уменьшение экспрессии KLRG1, например, на Т-клетках памяти, например, предшественниках Т-клеток памяти; или

vii) увеличение количества предшественников Т-клеток памяти, например, клеток с любой или комбинацией из следующих характеристик: увеличенный уровень CD62L<sup>high</sup>, увеличенный уровень CD127<sup>high</sup>, увеличенный уровень CD27<sup>+</sup>, сниженный уровень KLRG1 и увеличенный уровень BCL2;

и где любое из вышеуказанных, например, i), ii), iii), iv), v), vi) или vii), происходит, например, по меньшей мере временно, например, по сравнению с индивидуумом без лечения.

В другом варианте осуществления введение низкой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR приводит к увеличенной или пролонгированной пролиферации CAR-экспрессирующих клеток, например, в культуре или у индивидуума, например, по сравнению с индивидуумом, котором не вводили CAR-экспрессирующие клетки, или индивидуумом, которому не проводили лечение. В некоторых вариантах осуществления увеличенная пролиферация ассоциирована с увеличением количества CAR-экспрессирующих клеток. В другом варианте осуществления введение низкой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR приводит к увеличенному уничтожению

злокачественных клеток CAR-экспрессирующими клетками, например, в культуре или у индивидуума, например, по сравнению с индивидуумом, которому не проводили лечение CAR-экспрессирующими клетками, или индивидуумом, которому не проводили лечение. В некоторых вариантах осуществления увеличенное уничтожение

5 злокачественных клеток ассоциировано со снижением объема опухоли.

В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в настоящем описании, вводят в комбинации с низкой усиливающей иммунитет дозой ингибитора mTOR, например, аллостерического ингибитора mTOR, например, RAD001, или каталитического ингибитора mTOR.

10 Например, введение низкой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR можно начинать до введения CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании; завершать до введения CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании; начинать в то же время, что и введение CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании; проводить с перекрыванием с введением CAR-экспрессирующей

15 клетки, описанной в настоящем описании; или продолжать после введения CAR-экспрессирующей клетки, описанной в настоящем описании.

Альтернативно или дополнительно, введение низкой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR может оптимизировать иммунные эффекторные клетки, подлежащие модификации способами инженерии для экспрессии молекулы CAR, описанной в

20 настоящем описании. В таких вариантах осуществления введение низкой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR, например, аллостерического ингибитора, например, RAD001, или каталитического ингибитора начинают или завершают до сбора от индивидуума иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или НК-клеток, подлежащих модификации способами инженерии для экспрессии молекулы CAR, описанной в настоящем описании.

В другом варианте осуществления иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки или НК-клетки, подлежащие модификации способами инженерии для экспрессии молекулы CAR, описанной в настоящем описании, например, после сбора от индивидуума, или CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, например,

30 Т-клетки или НК-клетки, например, до введения индивидууму, можно культивировать в присутствии низкой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR.

В одном варианте осуществления введение индивидууму низкой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR включает введение, например, один раз в неделю, например, в дозированной форме с немедленным высвобождением, от 0,1 до 20, от 0,5

35 до 10, от 2,5 до 7,5, от 3 до 6, или приблизительно 5 мг RAD001, или его биоэквивалентной дозы. В одном варианте осуществления введение индивидууму низкой усиливающей иммунитет дозы ингибитора mTOR включает введение, например, один раз в неделю, например, в дозированной форме с замедленным высвобождением, от 0,3 до 60, от 1,5 до 30, от 7,5 до 22,5, от 9 до 18, или приблизительно 15 мг RAD001, или его

40 биоэквивалентной дозы.

В одном варианте осуществления доза ингибитора mTOR ассоциирована с или обеспечивает ингибирование mTOR по меньшей мере на 5, но не более чем на 90%, по меньшей мере на 10 но не более чем на 90%, по меньшей мере на 15, но не более чем на 90%, по меньшей мере на 20 но не более чем на 90%, по меньшей мере на 30 но не

45 более чем на 90%, по меньшей мере на 40 но не более чем на 90%, по меньшей мере на 50 но не более чем на 90%, по меньшей мере на 60 но не более чем на 90%, по меньшей мере на 70 но не более чем на 90%, по меньшей мере на 5 но не более чем на 80%, по меньшей мере на 10 но не более чем на 80%, по меньшей мере на 15, но не более чем

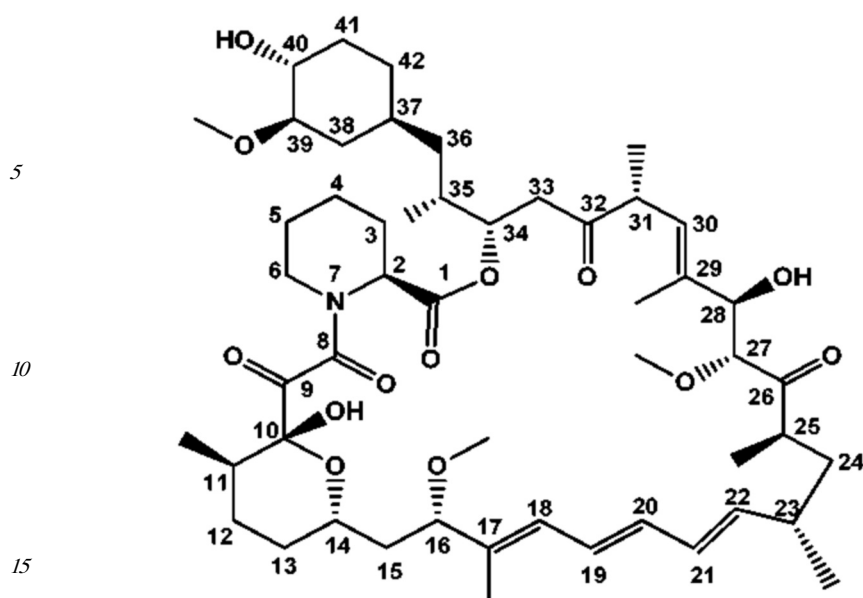
на 80%, по меньшей мере на 20 но не более чем на 80%, по меньшей мере на 30 но не более чем на 80%, по меньшей мере на 40 но не более чем на 80%, по меньшей мере на 50 но не более чем на 80%, по меньшей мере на 60 но не более чем на 80%, по меньшей мере на 5 но не более чем на 70%, по меньшей мере на 10 но не более чем на 70%, по меньшей мере на 15, но не более чем на 70%, по меньшей мере на 20 но не более чем на 70%, по меньшей мере на 30 но не более чем на 70%, по меньшей мере на 40 но не более чем на 70%, по меньшей мере на 50 но не более чем на 70%, по меньшей мере на 5 но не более чем на 60%, по меньшей мере на 10 но не более чем на 60%, по меньшей мере на 15, но не более чем на 60%, по меньшей мере на 20 но не более чем на 60%, по меньшей мере на 30 но не более чем на 60%, по меньшей мере на 40 но не более чем на 60%, по меньшей мере на 5 но не более чем на 50%, по меньшей мере на 10 но не более чем на 50%, по меньшей мере на 15, но не более чем на 50%, по меньшей мере на 20 но не более чем на 50%, по меньшей мере на 30 но не более чем на 50%, по меньшей мере на 40 но не более чем на 50%, по меньшей мере на 5 но не более чем на 40%, по меньшей мере на 10 но не более чем на 40%, по меньшей мере на 15, но не более чем на 40%, по меньшей мере на 20 но не более чем на 40%, по меньшей мере на 30 но не более чем на 40%, по меньшей мере на 35 но не более чем на 40%, по меньшей мере на 5 но не более чем на 30%, по меньшей мере на 10 но не более чем на 30%, по меньшей мере на 15, но не более чем на 30%, по меньшей мере на 20 но не более чем на 30%, или по меньшей мере на 25 но не более чем на 30%.

Степень ингибирования mTOR можно выражать в качестве, или она соответствует, степени ингибирования киназы P70 S6, например, степень ингибирования mTOR можно определять по уровню снижения активности киназы P70 S6, например, по снижению фосфорилирования субстрата киназы P70 S6. Уровень ингибирования mTOR можно оценивать различными способами, такими как измерение активности киназы P70 S6 с помощью анализа Boulay, как описано в патентной заявке США № 2015/01240036, включенной в настоящее описание в качестве ссылки, или как описано в патенте США № 7727950, включенном в настоящее описание в качестве ссылки; измерение уровня фосфорилированной S6 с использованием вестерн-блоттинга; или оценка изменения соотношения отрицательных по PD1 иммунных эффекторных клеток и положительных по PD1 иммунных эффекторных клеток.

Как используют в рамках изобретения, термин "ингибитор mTOR" относится к соединению или лиганду, или их фармацевтически приемлемой соли, которые ингибируют киназу mTOR в клетке. В одном варианте осуществления ингибитор mTOR представляет собой аллостерический ингибитор. В одном варианте осуществления ингибитор mTOR представляет собой аллостерический ингибитор. Аллостерические ингибиторы mTOR включают нейтральное трициклическое соединение рапамицин (сиролимус), родственные рапамицину соединения, которые представляют собой соединения, имеющие структурное и функциональное сходство с рапамицином, включая, например, производные рапамицина, аналоги рапамицина (также называемые рапалогами) и другие макролидные соединения, которые ингибируют активность mTOR. В одном варианте осуществления ингибитор mTOR представляет собой каталитический ингибитор.

Рапамицин представляет собой известный макролидный антибиотик, продуцируемый *Streptomyces hygroscopicus*, имеющий структуру, показанную в формуле А.





(A)

См., например, McAlpine, J.B., et al., J. Antibiotics (1991) 44: 688; Schreiber, S.L., et al., J. Am. Chem. Soc. (1991) 113: 7433; патент США № 3929992. Существуют различные

20

схемы нумерации, предложенные для рапамицина. Во избежание путаницы, когда в настоящем описании упоминаются конкретные аналоги рапамицина, названия

приведены относительно рапамицина с использованием схемы нумерации формулы А.

Аналоги рапамицина, пригодные в рамках изобретения, представляют собой,

25

например, O-замещенные аналоги, в которых гидроксильная группа на циклогексильном кольце рапамицина заменена  $OR_1$ , где  $R_1$  представляет собой гидроксилалкил,

30

гидроксилалкоксиалкил, ациламиноалкил или аминоалкил; например RAD001, также известный как эверолимус, как описано в US 5665772 и WO94/09010, содержимое которых включено в качестве ссылки. Другие пригодные аналоги рапамицина включают аналоги

35

рапамицина, замещенные в положении 26 или 28. Аналог рапамицина может представлять собой эпимер аналога, упомянутого выше, в частности, эпимер аналога,

замещенного в положении 40, 28 или 26, и он необязательно может быть далее гидрогенизирован, например, как описано в US 6015815, WO95/14023 и WO99/15530,

содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки, например АВТ578, также известный как зотаролимус, или аналог рапамицина, описанный в US

40

7091213, WO98/02441 и WO01/14387, содержание которых включено в качестве ссылки, например AP23573, также известный как рифафоролимус.

Примеры аналогов рапамицина, пригодных для применения в рамках настоящего изобретения, из US 5665772 включают, но не ограничиваются ими, 40-O-бензилрапамицин, 40-O-(4'-гидроксиметил)бензилрапамицин, 40-O-[4'-(1,2-

40

дигидроксиэтил)]бензилрапамицин, 40-O-аллилрапамицин, 40-O-[3'-(2,2-диметил-1,3-диоксолан-4(S)-ил)-проп-2'-ен-1'-ил]-рапамицин, (2'E,4'S)-40-O-(4',5'-дигидрокси-2'-ен-1'-ил)рапамицин, 40-O-(2-гидрокси)этоксикарбонилметилрапамицин, 40-O-(2-гидрокси)этилрапамицин, 40-O-(3-гидрокси)пропилрапамицин, 40-O-(6-гидрокси)гексилрапамицин, 40-O-[2-(2-гидрокси)этокси]этилрапамицин, 40-O-[(3S)-2,2-диметилдиоксолан-3-ил]

45

метилрапамицин, 40-O-[(2S)-2,3-дигидроксипроп-1-ил]рапамицин, 40-O-(2-ацетокси)этилрапамицин, 40-O-(2-никотиноилокси)этилрапамицин, 40-O-[2-(N-морфолино)ацетокси]этилрапамицин, 40-O-(2-N-имидазолилацетокси)этилрапамицин, 40-O-[2-(N-метил-N'-пиперазинил)ацетокси]этилрапамицин, 39-O-десметил-39,40-O-O-

этиленрапамицин, (26R)-26-дигидро-40-О-(2-гидрокси)этилрапамицин, 40-О-(2-аминоэтил)рапамицин, 40-О-(2-ацетаминоэтил)рапамицин, 40-О-(2-никотинамидоэтил)рапамицин, 40-О-(2-(N-метилимидазо-2'-илкарбэтоксамидо)этил)рапамицин, 40-О-(2-этоксикарбониламиноэтил)рапамицин, 40-О-(2-толилсульфонамидоэтил)рапамицин и  
5 40-О-[2-(4',5'-дикарбэтокси-1',2',3'-триазол-1'-ил)этил]рапамицин.

Другие аналоги рапамицина, пригодные в рамках настоящего изобретения, представляют собой аналоги, в которых гидроксильная группа на циклогексильном кольце рапамицина и/или гидроксигруппа в положении 28 заменены группой сложного гидроксифира, например, аналоги рапамицина, описанные в US RE44768, например  
10 темсиролимус.

Другие аналоги рапамицина, пригодные в рамках настоящего изобретения, включают аналоги, в которых метоксигруппа в положении 16 заменена другим заместителем, предпочтительно (необязательно гидроксизамещенным) алкинилокси, бензилом, ортометоксибензил или хлорбензилом, и/или где метоксигруппа в положении 39 удалена  
15 вместе с углеродом 39, так что циклогексильное кольцо рапамицина становится циклопентильным кольцом, лишенным метоксигруппы в положении 39; например, как описано в WO95/16691 и WO96/41807, содержание которых включено в качестве ссылки. Аналоги можно далее модифицировать, так что гидроксильная группа в положении 40 рапамицина алкилирован и/или 32-карбонил восстановлен.

Аналоги рапамицина из WO95/16691 включают, но не ограничиваются ими, 16-деметокси-16-(пент-2-инил)оксирапамицин, 16-деметокси-16-(бут-2-инил)оксирапамицин, 16-деметокси-16-(пропаргил)оксирапамицин, 16-деметокси-16-(4-гидроксибут-2-инил)оксирапамицин, 16-деметокси-16-бензилокси-40-О-(2-гидроксиэтил)рапамицин, 16-деметокси-16-бензилоксирапамицин, 16-деметокси-16-ортометоксибензилрапамицин,  
20 16-деметокси-40-О-(2-метоксиэтил)-16-пент-2-инил)оксирапамицин, 39-деметокси-40-дезоксидезокси-39-формил-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезоксидезокси-39-гидроксиметил-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезоксидезокси-39-карбоксий-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезоксидезокси-39-(4-метилпиперазин-1-ил)карбонил-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезоксидезокси-39-(морфолин-4-ил)карбонил-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезоксидезокси-39-  
30 [N-метил,N-(2-пиридин-2-илэтил)]карбамоил-42-норрапамицин и 39-деметокси-40-дезоксидезокси-39-(п-толуолсульфонилгидразонометил)-42-норрапамицин.

Аналоги рапамицина из WO96/41807 включают, но не ограничиваются ими, 32-деоксоррапамицин, 16-О-пент-2-инил-32-деоксоррапамицин, 16-О-пент-2-инил-32-деоксо-40-О-(2-гидроксиэтил)рапамицин, 16-О-пент-2-инил-32-(S)-дигидро-40-О-(2-гидроксиэтил)  
35 рапамицин, 32(S)-дигидро-40-О-(2-метокси)этилрапамицин и 32(S)-дигидро-40-О-(2-гидроксиэтил)рапамицин.

Другим пригодным аналогом рапамицина является умиролимус, как описано в US2005/0101624, содержание которой включено в качестве ссылки.

RAD001, иначе известный как эверолимус (Afinitor®), имеет химическое название  
40 (1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-дигидрокси-12-((1R)-2-((1S,3R,4R)-4-(2-гидроксиэтокси)-3-метоксициклогексил)-1-метилэтил)-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-11,36-диокса-4-азатрицикло[30,3,1,04,9]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-2,3,10,14,20-пентаон

Следующие примеры аллостерических ингибиторов mTOR включают сиролимус (рапамицин, AY-22989), 40-[3-гидрокси-2-(гидроксиметил)-2-метилпропаноат]рапамицин (также называемый темсиролимусом или CCI-779) и ридафоролимус (AP-23573/МК-8669). Другие примеры аллостерических ингибиторов mTOR включают зотаролимус (ABT578) и умиролимус.

Альтернативно или дополнительно, было обнаружено, что каталитические конкурирующие с АТФ ингибиторы mTOR нацелены на киназный домен mTOR прямо и нацелены как на mTORC1, так и на mTORC2. Также они являются более эффективными ингибиторами mTORC1, чем такие аллостерические ингибиторы mTOR, как рапамицин, поскольку они модулируют устойчивую к рапамицину mTORC1 активность, такую как фосфорилирование 4EBP1-T37/46 и кэп-зависимая трансляция.

Каталитические ингибиторы включают: BEZ235 или 2-метил-2-[4-(3-метил-2-оксо-8-хинолин-3-ил-2,3-дигидро-имидазо[4,5-с]хинолин-1-ил)фенил]пропионитрил, или его форму монотозилата. Синтез BEZ235 описан в WO2006/122806; CCG168 (иначе известный как AZD-8055, Chresta, С.М., et al., Cancer Res, 2010, 70(1), 288-298), который имеет химическое название {5-[2,4-бис-((S)-3-метилморфолин-4-ил)пиридо[2,3d]пиримидин-7-ил]-2-метоксифенил} метанол; 3-[2,4-бис[(3S)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-d]пиримидин-7-ил]-N-метилбензамид (WO09104019); 3-(2-аминобензо[d]оксазол-5-ил)-1-изопропил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амин (WO10051043 и WO2013023184); N-(3-(N-(3-((3,5-диметоксифенил)амино)хиноксалин-2-ил)сульфамоил)фенил)-3-метокси-4-метилбензамид (WO07044729 и WO12006552); PKI-587 (Venkatesan, А.М., J. Med.Chem., 2010, 53, 2636-2645), который имеет химическое название 1-[4-[4-(диметиламино)пиперидин-1-карбонил]фенил]-3-[4-(4,6-диморфолино-1,3,5-триазин-2-ил)фенил]мочевина; GSK-2126458 (ACS Med. Chem. Lett., 2010, 1, 39-43), который имеет химическое название 2,4-дифтор-N-{2-метокси-5-[4-(4-пиридазинил)-6-хинолинил]-3-пиридирил} бензолсульфонамид; 5-(9-изопропил-8-метил-2-морфолино-9H-пурин-6-ил)пиримидин-2-амин (WO10114484); (E)-N-(8-(6-амино-5-(трифторметил)пиридин-3-ил)-1-(6-(2-цианопропан-2-ил)пиридин-3-ил)-3-метил-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2(3H)-илиден)цианамид (WO12007926).

Следующие примеры каталитических ингибиторов mTOR включают 8-(6-метокси-пиридин-3-ил)-3-метил-1-(4-пиперазин-1-ил-3-трифторметилфенил)-1,3-дигидроимидазо[4,5-с]хинолин-2-он (WO2006/122806) и Ku-0063794 (Garcia-Martinez JM, et al., Biochem J., 2009, 421(1), 29-42. Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR)). WYE-354 является другим примером каталитического ингибитора mTor (Yu K, et al. (2009). Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. Cancer Res. 69(15): 6232-6240).

Ингибиторы mTOR, пригодные в соответствии с настоящим изобретением, также включают пролекарства, производные, фармацевтически приемлемые соли или аналоги любого из указанных выше средств.

Ингибиторы mTOR, такие как RAD001, можно составлять для доставки на основе хорошо известных в данной области способов на основе конкретных дозировок, описанных в настоящем описании. В частности, в патенте США 6004973 (включенном в настоящее описание в качестве ссылки) представлены примеры составов, которые могут использоваться с ингибиторами mTOR, описанными в настоящем описании.

#### *Ингибиторы ингибиторных молекул/ингибиторы точки контроля*

В одном варианте осуществления индивидууму можно вводить средство, которое повышает активность экспрессирующей CAR клетки. Например, в одном варианте осуществления средство может представлять собой средство, которое ингибирует молекулу точки контроля. Молекулы точки контроля, например, белок запрограммированной смерти 1 (PD1), в некоторых вариантах осуществления могут уменьшать способность экспрессирующей CAR клетки индуцировать иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибиторных молекул включают PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA,

BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAL9, аденозин и TGFR (например, TGFR-бета). В некоторых вариантах осуществления CAR-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем описании, содержит костимулирующий рецептор переключения, например, как описано в WO 2013/019615, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Способы, описанные в настоящем описании, могут включать введение CAR-экспрессирующей клетки в комбинации с ингибитором точки контроля. В одном варианте осуществления индивидуум является полностью отвечающим индивидуумом. В другом варианте осуществления индивидуум является частично отвечающим или не отвечающим индивидуумом, и, например, в некоторых вариантах осуществления ингибитор точки контроля вводят до введения CAR-экспрессирующей клетки, например, за две недели, 12 суток, 10 суток, 8 суток, одну неделю, 6 суток, 5 суток, 4 суток, 3 суток, 2 суток или 1 сутки до введения CAR-экспрессирующей клетки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор точки контроля вводят одновременно с CAR-экспрессирующей клеткой.

Ингибирование молекулы точки контроля, например, посредством ингибирования уровня ДНК, РНК или белка, может оптимизировать эффективность экспрессирующей CAR клетки. В некоторых вариантах осуществления для ингибирования экспрессии молекулы точки контроля в CAR-экспрессирующей клетке можно использовать ингибиторную нуклеиновую кислоту, например, ингибиторную нуклеиновую кислоту, например дцРНК, например миРНК или кшРНК; короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные кластерами (CRISPR), нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN) или эндонуклеазу с цинковыми пальцами (ZFN), например, как описано в настоящем описании. В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой кшРНК. В одном варианте осуществления ингибиторная молекула ингибируется в CAR-экспрессирующей клетке. В этих вариантах осуществления молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы точки контроля, связана с нуклеиновой кислотой, которая кодирует компонент, например, все из компонентов, CAR.

В одном варианте осуществления ингибитор ингибиторного сигнала может представлять собой, например, антитело или фрагмент антитела, которые связываются с ингибиторной молекулой. Например, средство может представлять собой антитело или фрагмент антитела, которые связываются с PD1, PD-L1, PD-L2 или CTLA4 (например, ипилимумаб (также называемый MDX-010 и MDX-101, и выпускаемый в продажу как Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; тремелимумаб (моноклональное IgG2-антитело, доступное от Pfizer, ранее известное как тицилимумаб, CP-675.206)). В одном варианте осуществления средство представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые связываются с TIM3. В одном варианте осуществления средство представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые связываются с LAG3. В одном варианте осуществления средство представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые связываются с CEACAM.

PD1 представляет собой ингибиторный представитель семейства рецепторов CD28, которое также включает CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Было показано, что два лиганда для PD1, PD-L1 и PD-L2, подавляют активацию Т-клеток при связывании с PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1

распространен в злокачественных опухолях человека (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). Иммунную супрессию можно обращать вспять путем ингибирования локального взаимодействия PD1 с PD-L1.

5 Антитела, фрагменты антител и другие ингибиторы PD1, PD-L1 и PD-L2 доступны в данной области известны и могут использоваться в комбинации с CAR против CD19, описанным в настоящем описании, например, CAR против CD19, описанным в  
 10 настоящем описании. Например, ниволумаб (также обозначаемый как BMS-936558 или MDX1106; Bristol-Myers Squibb) представляет собой полностью человеческое моноклональное IgG4-антитело, которое специфически блокирует PD1. Ниволумаб  
 (клон 5C4) и другие моноклональные антитела человека, которые специфически связываются с PD1, описаны в US 8008449 и WO2006/121168. Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) представляет собой гуманизированное моноклональное IgG1k-антитело, которое связывается с PD1. Пидилизумаб и другие гуманизированные моноклональные  
 15 антитела против PD1 описаны в WO2009/101611. Ламбролизумаб (также обозначаемый как MK03475; Merck) представляет собой гуманизированное моноклональное IgG4-антитело, которое связывается с PD-1. Ламбролизумаб и другие гуманизированные антитела против PD-1 описаны в US 8354509 и WO2009/114335. MEDI4736 (Medimmune) представляет собой моноклональное антитело человека, которое связывается с PDL1.  
 20 MDPL3280A (Genentech/Roche) представляет собой моноклональное IgG1-антитело человека с оптимизированной Fc-областью, которое связывается с PD-L1. MDPL3280A и другие моноклональные антитела человека к PD-L1 описаны в патенте США № 7943743 и публикации США № 20120039906. Другие связывающие PD-L1 средства включают YW243.55.S70 (вариабельные области тяжелой и легкой цепей представлены  
 25 в SEQ ID NO: 20 и 21 в WO2010/077634) и MDX-1105 (также обозначаемый как BMS-936559, и, например, связывающие PD-L1 средства, описанные в WO2007/005874). AMP-224 (B7-DCI; Amplimmune; например, описанный в WO2010/027827 и WO2011/066342), представляет собой слитый растворимый рецептор PD-L2-Fc, который блокирует взаимодействие между PD1 и B7-H1. Другие антитела против PD1 включают AMP 514  
 30 (Amplimmune), среди прочих, например, антитела против PD1, описанные в US 8609089, US 2010028330 и/или US 20120114649.

В одном варианте осуществления антитело против PD-1 или его фрагмент представляет собой молекулу антитела против PD-1, описанную в US 2015/0210769, опубликованной 30 июля 2015 года, под названием "Antibody Molecules to PD-1 and Uses  
 35 Thereof", включенной в качестве ссылки в полном объеме. В одном варианте осуществления молекула антитела против PD-1 включает по меньшей мере одну, два, три, четыре, пять или шесть CDR (или, в совокупности, все CDR) из вариабельной области тяжелой или легкой цепи антитела, выбранного из любого из VAP049-hum01, VAP049-hum02, VAP049-hum03, VAP049-hum04, VAP049-hum05, VAP049-hum06, VAP049-  
 40 hum07, VAP049-hum08, VAP049-hum09, VAP049-hum10, VAP049-hum11, VAP049-hum12, VAP049-hum13, VAP049-hum14, VAP049-hum15, VAP049-hum16, VAP049-Clone-A, VAP049-Clone-B, VAP049-Clone-C, VAP049-Clone-D, или VAP049-Clone-E; или как описано в таблице 1 US 2015/0210769, или кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в таблице 1; или последовательности, по существу идентичной  
 45 (например, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичной) любой из вышеупомянутых последовательностей; или в высокой степени сходные CDR, например, CDR, которые являются идентичными или которые имеют по меньшей мере одно аминокислотное изменение, но не более двух, трех или четырех

изменений (например, замен, делеций или инсерций, например, консервативных замен).

В другом варианте осуществления молекула антитела против PD-1 содержит по меньшей мере одну, две, три или четыре переменных области из антитела, описанного в настоящем описании, например, антитела, выбранного из любого из VAP049-hum01, VAP049-hum02, VAP049-hum03, VAP049-hum04, VAP049-hum05, VAP049-hum06, VAP049-hum07, VAP049-hum08, VAP049-hum09, VAP049-hum10, VAP049-hum11, VAP049-hum12, VAP049-hum13, VAP049-hum14, VAP049-hum15, VAP049-hum16, VAP049-Clone-A, VAP049-Clone-B, VAP049-Clone-C, VAP049-Clone-D или VAP049-Clone-E; или как описано в таблице 1 US 2015/0210769, или кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в таблице 1; или последовательности, по существу идентичной (например, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичной) любой из вышеуказанных последовательностей.

TIM3 (Т-клеточный иммуноглобулин 3) также подавляет Т-клеточную функцию, в частности, в секретирующих IFN- $\gamma$  CD4+ Т-хелперных 1 и CD8+ цитотоксических Т-клетках 1, и он играет важную роль в устранении Т-клеток. Ингибирование взаимодействия между TIM3 и его лигандами, например галектином-9 (Gal9), фосфотидилсеринем (PS) и HMGB1, может увеличить иммунный ответ. Антитела, фрагменты антител и другие ингибиторы TIM3 и его лиганды доступны в данной области и могут быть использованы в комбинации с CAR против CD19, описанным в настоящем описании. Например, антитела, фрагменты антитела, низкомолекулярные соединения или пептидные ингибиторы, которые нацелены на TIM3, связываются с IgV-доменом TIM3, ингибируя взаимодействия с его лигандами. Антитела и пептиды, которые ингибируют TIM3, описаны в WO2013/006490 и US20100247521. Другие антитела против TIM3 включают гуманизированные версии RMT3-23 (описанные в Ngiow et al., 2011, Cancer Res, 71:3540-3551) и клон 8В.2С12 (описанный в Monney et al., 2002, Nature, 415: 536-541). Биспецифические антитела, которые ингибируют TIM3 и PD-1, описаны в US20130156774.

В одном варианте осуществления антитело против TIM3 или его фрагмент представляет собой молекулу антитела против TIM3, как описано в US 2015/0218274, под названием "Antibody Molecules to TIM3 and Uses Thereof", включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В другом варианте осуществления молекула антитела против TIM3 включает по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR (или, в совокупности, все CDR) из переменной области тяжелой и легкой цепей антитела, выбранного из любого из АВТІМ3, АВТІМ3-hum01, АВТІМ3-hum02, АВТІМ3-hum03, АВТІМ3-hum04, АВТІМ3-hum05, АВТІМ3-hum06, АВТІМ3-hum07, АВТІМ3-hum08, АВТІМ3-hum09, АВТІМ3-hum10, АВТІМ3-hum11, АВТІМ3-hum12, АВТІМ3-hum13, АВТІМ3-hum14, АВТІМ3-hum15, АВТІМ3-hum16, АВТІМ3-hum17, АВТІМ3-hum18, АВТІМ3-hum19, АВТІМ3-hum20, АВТІМ3-hum21, АВТІМ3-hum22, АВТІМ3-hum23; или как описано в таблицах 1-4 US 2015/0218274; или кодируемого нуклеотидной последовательностью, приведенной в таблицах 1-4; или последовательности, по существу идентичной (например, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичной) любой из вышеупомянутых последовательностей, или в высокой степени сходные CDR, например, CDR, которые являются идентичными или которые имеют по меньшей мере одно аминокислотное изменение, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замен, делеций или инсерций, например, консервативных замен).

В другом варианте осуществления молекула антитела против TIM3 содержит по меньшей мере одну, две, три или четыре переменных области из антитела, описанного

в настоящем описании, например, антитела, выбранного из любого из АВТІМ3, АВТІМ3-hum01, АВТІМ3-hum02, АВТІМ3-hum03, АВТІМ3-hum04, АВТІМ3-hum05, АВТІМ3-hum06, АВТІМ3-hum07, АВТІМ3-hum08, АВТІМ3-hum09, АВТІМ3-hum10, АВТІМ3-hum11, АВТІМ3-hum12, АВТІМ3-hum13, АВТІМ3-hum14, АВТІМ3-hum15, АВТІМ3-hum16, АВТІМ3-hum17, АВТІМ3-hum18, АВТІМ3-hum19, АВТІМ3-hum20, АВТІМ3-hum21, АВТІМ3-hum22, АВТІМ3-hum23; или как описано в таблицах 1-4 US 2015/0218274; или кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в таблице 1-4; или последовательности, по существу идентичной (например, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичной) любой из вышеупомянутых последовательностей.

В других вариантах осуществления средство, которое повышает активность CAR-экспрессирующей клетки, представляет собой ингибитор SEACAM (например, ингибитор SEACAM-1, SEACAM-3 и/или SEACAM-5). В одном варианте осуществления ингибитор SEACAM представляет собой молекулу антитела против SEACAM. Иллюстративные антитела против SEACAM-1 описаны в WO 2010/125571, WO 2013/082366 WO 2014/059251 и WO 2014/022332, например моноклональное антитело 34B1, 26H7 и 5F4; или их рекомбинантные формы, как описано, например, в US 2004/0047858, US 7132255 и WO 99/052552. В других вариантах осуществления антитело против SEACAM связывается с SEACAM-5, как описано, например, в Zheng et al. *PLoS One*. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529 (DOI:10.1371/journal.pone.0021146) или перекрестно реагирует с SEACAM-1 и SEACAM-5, как описано, например, в WO 2013/054331 и US 2014/0271618.

Без связи с теорией, полагают, что канцероэмбриональные антигенные молекулы клеточной адгезии (SEACAM), такие как SEACAM-1 и SEACAM-5, опосредуют, по меньшей мере частично, ингибирование противоопухолевого иммунного ответа (см. например, Markel et al. *J Immunol*. 2002 Mar 15; 168(6):2803-10; Markel et al. *J Immunol*. 2006 Nov 1; 177(9):6062-71; Markel et al. *Immunology*. 2009 Feb; 126(2):186-200; Markel et al. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Feb;59(2):215-30; Ortenberg et al. *Mol Cancer Ther*. 2012 Jun; 11(6):1300-10; Stern et al. *J Immunol*. 2005 Jun 1; 174(11):6692-701; Zheng et al. *PLoS One*. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529). Например, SEACAM-1 описан в качестве гетерофильного лиганда для TIM-3, играющего роль в опосредуемой TIM-3 толерантности и устранении Т-клеток (см. например, WO 2014/022332; Huang, et al. (2014) *Nature* doi:10.1038/nature13848). В некоторых вариантах осуществления показано, что совместная блокада SEACAM-1 и TIM-3 усиливает противоопухолевый иммунный ответ в моделях с ксенотрансплантатом рака ободочной и прямой кишки (см., например, WO 2014/022332; Huang, et al. (2014), выше). В других вариантах осуществления совместная блокада SEACAM-1 и PD-1 снижает толерантность Т-клеток, как описано, например, в WO 2014/059251. Таким образом, ингибиторы SEACAM можно использовать с другими иммуномодуляторами, описанными в настоящем описании (например, ингибиторы PD-1 и/или ингибиторы TIM-3) для усиления иммунного ответа против злокачественной опухоли, например, меланомы, рака легкого (например, NSCLC), рака мочевого пузыря, рака толстого кишечника, рака яичника и других злокачественных опухолей, как описано в настоящем описании.

LAG3 (ген активации лимфоцитов 3 или CD223) представляет собой молекулу клеточной поверхности, экспрессируемую на активированных Т-клетках и В-клетках, для которой было показано, что она играет роль в устранении CD8+ Т-клеток. Антитела, фрагменты антитела и другие ингибиторы LAG3 и его лиганды доступны в данной области, и их можно использовать в комбинации с CAR против CD19, описанным в настоящем описании. Например, BMS-986016 (Bristol-Myers Squib) представляет собой

моноклональное антитело, которое нацелено на LAG3. IMP701 (Immutep) представляет собой антитело-антагонист LAG3 и IMP731 (Immutep и GlaxoSmithKline) представляет собой истощающее антитело против LAG3. Другие ингибиторы LAG3 включают IMP321 (Immutep), который представляет собой рекомбинантный слитый белок растворимой части LAG3 и Ig, который связывается с молекулами МНС класса II и активирует антигенпредставляющие клетки (АПК). Другие антитела описаны, например, в WO2010/019570.

В некоторых вариантах осуществления средство, которое повышает активность CAR-экспрессирующей клетки, может представлять собой, например, слитый белок, содержащий первый домен и второй домен, где первый домен представляет собой ингибиторную молекулу или ее фрагмент, и второй домен представляет собой полипептид, который ассоциирован с положительным сигналом, например, полипептид, содержащий внутриклеточный сигнальный домен, как описано в настоящем описании (также обозначаемый в настоящем описании как ингибиторный CAR или iCAR). В некоторых вариантах осуществления полипептид, который ассоциирован с положительным сигналом, может включать костимулирующий домен CD28, CD27, ICOS, например, внутриклеточный сигнальный домен CD28, CD27 и/или ICOS, и/или первичный сигнальный домен, например, из CD3-зета, например, описанный в настоящем описании. В одном варианте осуществления слитый белок экспрессируется той же клеткой, которая экспрессирует CAR. В другом варианте осуществления слитый белок экспрессируется клеткой, например, Т-клеткой, которая не экспрессирует CAR против CD19.

В одном варианте осуществления внеклеточный домен (ECD) молекулы точки контроля, например, молекулы точки контроля, описанной в настоящем описании, например, такой как белок запрограммированной смерти 1 (PD1), может быть слит с трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом, описанным в настоящем описании, например, внутриклеточным сигнальным доменом, содержащим костимулирующий сигнальный домен, например, такой как 41BB 0X40, Cd28, CD27, и/или первичный сигнальный домен, например, из CD3-зета. В одном варианте осуществления ингибиторный CAR, например, CAR против PD1, можно использовать в комбинации с другим CAR, например, CAR против CD19 (например, CAR против CD19R). В одном варианте осуществления RCAR против PD1 (или CAR против PD1) повышает персистенцию Т-клеток. Примеры ингибиторных молекул включают PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, МНС класса I, МНС класса II, GAL9, аденозин и TGFR (например, TGFR-бета). В одном варианте осуществления ингибиторная молекула CAR содержит первый полипептид, например, из ингибиторной молекулы, такой как PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, МНС класса I, МНС класса II, GAL9, аденозин, и TGFR (например, TGFR-бета), или фрагмент любого из них (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена любого из них), и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем описании (например, содержащий костимулирующий домен (например, 41BB, CD27 или CD28, например, как описано в настоящем описании) и/или первичный сигнальный домен (например, сигнальный домен CD3-зета, описанный в настоящем описании).



В одном варианте осуществления ингибиторная молекула CAR содержит внеклеточный домен (ECD) PD1, слитый с трансмембранным доменом и внутриклеточными доменами, такими как 41BB и CD3-зета (также обозначаемый в настоящем описании как CAR против PD1). В одном варианте осуществления CAR против PD1 повышает персистенцию CAR-экспрессирующих клеток. В одном варианте осуществления CAR против PD1 содержит внеклеточный домен PD1, указанный в SEQ ID NO: 44. В одном варианте осуществления CAR против PD1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления CAR против PD1 содержит аминокислотную последовательность, предоставленную в качестве SEQ ID NO: 41.

В одном варианте осуществления CAR против PD1, например, CAR против PD1, описанный в настоящем описании, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, предоставленной в качестве SEQ ID NO: 42, или по меньшей мере содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую внеклеточный домен PD1 (представленную как SEQ ID NO: 101).

В некоторых вариантах осуществления ингибиторный внеклеточный домен обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с или отличается не более чем на 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от соответствующих остатков встречающейся в природе ингибиторной молекулы, например, встречающейся в природе первичной стимулирующей молекулы человека, описанной в настоящем описании.

В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например ингибирует, Т-клеточную функцию, функционально связана с промотором, например происходящим из H1 или U6 промотором, так что молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например ингибирует, Т-клеточную функцию, экспрессируется, например экспрессируется в экспрессирующей CAR клетке. См., например, Tiscornia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA," Chapter 3, Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA (eds. Friedmann and Rossi). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007; Brummelkamp TR, *et al.* (2002) *Science* 296: 550-553; Miyagishi M, *et al.* (2002) *Nat. Biotechnol.* 19: 497-500. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например ингибирует, Т-клеточную функцию, находится на одном и том же векторе, например лентивирусном векторе, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует компонент, например все компоненты, CAR. В таком варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например ингибирует, Т-клеточную функцию, расположена на векторе, например лентивирусном векторе, с 5'-или 3'-стороны от нуклеиновой кислоты, которая кодирует компонент, например все компоненты, CAR.

В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например ингибирует, Т-клеточную функцию, находится на векторе, отличном от вектора, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует компонент, например все компоненты, CAR. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует

экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например ингибирует, Т-клеточную функцию, временно экспрессируется в экспрессирующей CAR клетке. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу ДНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например ингибирует, Т-клеточную функцию, стабильно встраивается в геном CAR-экспрессирующей клетки. В одном варианта осуществления молекула, которая модулирует или регулирует, например ингибирует, Т-клеточную функцию представляет собой PD-1.

В некоторых вариантах осуществления, средство, которое повышает активность CAR-экспрессирующей клетки, например, ингибитор ингибиторной молекулы, вводят в комбинации с аллогенным CAR, например, аллогенным CAR, описанным в настоящем описании (например, описанным в разделе "Аллогенный CAR" настоящего описания).

#### **CAR с рецептором натуральных киллеров (NKR)**

В одном варианте осуществления молекула CAR, описанная в настоящем описании, содержит один или несколько компонентов рецептора натуральных киллеров (NKR), тем самым формируя NKR-CAR. Компонент NKR может представлять собой трансмембранный домен, шарнирный домен или цитоплазматический домен из любого из следующих рецепторов натуральных киллеров: иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток (KIR), например, KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 и KIR3DP1; натуральный рецептор цитотоксичности (NCR), например, NKp30, NKp44, NKp46; рецепторы иммунных клеток семейства сигнальной молекулы активации лимфоцитов (SLAM), например, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME и CD2F-10; Fc-рецептор (FcR), например, CD16 и CD64; и рецепторы Ly49, например, LY49A, LY49C. Молекулы NKR-CAR, описанные в настоящем описании, могут взаимодействовать с адаптерной молекулой или внутриклеточным сигнальным доменом, например DAP12. Иллюстративные конфигурации и последовательности молекул CAR, содержащих компоненты NKR, описаны в международной публикации № WO2014/145252, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

#### **Расщепленный CAR**

В некоторых вариантах осуществления в CAR-экспрессирующих клетках используется расщепленный CAR. Подход расщепленных CAR более подробно описан в публикациях WO2014/055442 и WO2014/055657. В кратком изложении, система расщепленного CAR включает клетку, экспрессирующую первый CAR, обладающий первым антигенсвязывающим доменом и костимулирующим доменом (например, 41BB), и клетка также экспрессирует второй CAR, обладающий вторым антигенсвязывающим доменом и внутриклеточным сигнальным доменом (например, CD3-зета). Когда клетка встречает первый антиген, костимулирующий домен активируется, и клетка пролиферирует. Когда клетка встречает второй антиген, внутриклеточный сигнальный домен активируется и начинается активность уничтожения клеток. Таким образом, CAR-экспрессирующая клетка полностью активируется в присутствии обоих антигенов.

#### **Стратегии регуляции химерных рецепторов антигена**

Существует много путей регуляции активности CAR. В некоторых вариантах осуществления является желательным регулируемый CAR (RCAR), где активность CAR можно контролировать для оптимизации безопасности и эффективности терапии CAR. Существует много путей регуляции активности CAR. Например, индуцибельный апоптоз с использованием, например, каспазы, слитой с доменом димеризации (см.,

например, Di Stasa et al., N Engl. J. Med. 2011 Nov. 3; 365(18):1673-1683), можно использовать в качестве переключателя безопасности при терапии CAR по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления клетки (например, Т-клетки или НК-клетки), экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, кроме того, содержат индуцибельный переключатель апоптоза, в котором каспаза человека (например, каспаза 9) или ее модифицированная версия является слитой с модификацией белка FKB человека, которая позволяет зависимую от условий димеризацию. В присутствии низкомолекулярного соединения, такого как рапалог (например, AP 1903, AP20187), индуцибельная каспаза (например, каспаза 9) активирует и приводит к быстрому апоптозу и гибели клеток (например, Т-клеток или НК-клеток), экспрессирующих CAR по настоящему изобретению. Примеры индуцибельного переключателя апоптоза на основе каспазы (или один или несколько аспектов такого переключателя) описаны, например, в US2004040047; US20110286980; US20140255360; WO1997031899; WO2014151960; WO2014164348; WO2014197638; WO2014197638; все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В другом примере CAR-экспрессирующие клетки также могут экспрессировать молекулу индуцибельной каспазы-9 (и-каспазы-9), которая при введении димеризующего лекарственного средства (например, римидуцид (также называемый AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) или AP20187 (Ariad)) приводит к активации каспазы-9 и апоптозу клеток. Молекула и-каспазы-9 содержит связывающий домен с химическим индуктором димеризации (CID), который опосредует димеризацию в присутствии CID. Это приводит к индуцибельному и селективному истощению CAR-экспрессирующих клеток. В некоторых случаях молекула и-каспазы-9 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты отдельно от CAR-кодирующего вектора(ов). В некоторых случаях, молекула и-каспазы-9 кодируется той же молекулой нуклеиновой кислоты, что и кодирующий CAR вектор. И-каспаза-9 может обеспечить переключатель безопасности, чтобы избежать какой-либо токсичности CAR-экспрессирующих клеток. См., например, Song et al. Cancer Gene Ther. 2008; 15(10):667-75; Clinical Trial Id. No. NCT02107963; и Di Stasi et al. N. Engl. J. Med. 2011; 365:1673-83.

Альтернативные стратегии для регуляции терапии CAR по настоящему изобретению включают низкомолекулярные соединения или антитела, которые инактивируют или выключают активность CAR, например, путем удаления CAR-экспрессирующих клеток, например, путем индукции антителозависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичности (ADCC). Например, CAR-экспрессирующие клетки, описанные в настоящем описании, также могут экспрессировать антиген, который распознается молекулами, способными индуцировать гибель клеток, например, индуцируемую ADCC или компонентом гибель клеток. Например, CAR-экспрессирующие клетки, описанные в настоящем описании, также могут экспрессировать рецептор, на который может быть нацелено антитело или фрагмент антитела. Примеры таких рецепторов включают EPCAM, VEGFR, интегрины (например, интегрины  $\alpha\text{v}\beta 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 13/4\beta 3$ ,  $\alpha 4\beta 7$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha\text{v}\beta 3$ ,  $\text{av}$ ), представители суперсемейства рецепторов TNF (например, TRAIL-R1, TRAIL-R2), рецептор PDGF, рецептор интерферона, рецептор фолатов, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, рецептор IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/рецептор IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/басигин, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7 и EGFR, и их укороченные версии (например, версии, в которых сохранены один или несколько внеклеточных эпитопов, но которые лишены одной или нескольких областей в цитоплазматическом

домене).

Например, CAR-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем описании, также может экспрессировать укороченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), который лишен способности к передаче сигнала, но сохраняет эпитоп, который  
 5 распознается молекулами, способными индуцировать ADCC, например, цетуксимаб (ERBITUX®), так что введение цетуксимаба индуцирует ADCC и последующее истощение CAR-экспрессирующих клеток (см., например, WO2011/056894, и Jonnalagadda et al., Gene Ther. 2013; 20(8)853-860). Другая стратегия включает экспрессию высококомпактного маркерного/суицидального гена, который сочетает в себе эпитопы-мишени как от  
 10 антигена CD32, так и от антигена CD20, в CAR-экспрессирующих клетках, описанных в настоящем описании, которые связывают ритуксимаб, что приводит к селективному истощению CAR-экспрессирующих клеток, например, посредством ADCC (см., например, Philip et al., Blood. 2014; 124(8)1277-1287). Другие способы истощения CAR-экспрессирующих клеток, описанных в настоящем описании, включают введение  
 15 CAMPATH, моноклонального антитела против CD52, которое селективно связывает и нацеливается на зрелые лимфоциты, например, CAR-экспрессирующие клетки, для разрушения, например, путем индукции ADCC. В других вариантах осуществления на CAR-экспрессирующую клетку можно селективно осуществлять нацеливание с использованием лиганда CAR, например, антиидиотипического антитела. В некоторых  
 20 вариантах осуществления антиидиотипическое антитело может вызывать активность эффекторных клеток, например, активность ADCC или ADC, тем самым уменьшая количество CAR-экспрессирующих клеток. В других вариантах осуществления лиганд CAR, например, антиидиотипическое антитело, можно связывать со средством, которое индуцирует уничтожение клеток, например, токсином, тем самым уменьшая количество  
 25 CAR-экспрессирующих клеток. Альтернативно молекулы CAR сами по себе можно конфигурировать так, чтобы активность можно было регулировать, например, включать и выключать, как описано ниже.

В других вариантах осуществления CAR-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем описании, также может экспрессировать белок-мишень, распознаваемый  
 30 средством, истощающим Т-клетки. В одном варианте осуществления белок-мишень представляет собой CD20 и истощающее Т-клетки средство представляет собой антитело против CD20, например, ритуксимаб. В таких вариантах осуществления истощающее Т-клетки средство вводят, когда является желательным снижение или устранение CAR-экспрессирующих клеток, например, для смягчения индуцированной CAR токсичности.  
 35 В других вариантах осуществления истощающее Т-клетки средство представляет собой антитело против CD52, например, алемтузумаб, как описано в разделе "Примеры" настоящего описания.

В других вариантах осуществления RCAR содержит набор полипептидов, как правило, два в наиболее простых вариантах осуществления, в котором компоненты стандартного  
 40 CAR, описанного в настоящем описании, например, антигенсвязывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен, находятся на отдельных полипептидах или представителях. В некоторых вариантах осуществления набор полипептидов включает переключатель димеризации, который в присутствии молекулы димеризации может связывать полипептиды друг с другом, например, может связывать антигенсвязывающий  
 45 домен с внутриклеточным сигнальным доменом. В одном варианте осуществления в CAR по настоящему изобретению используется переключатель димеризации, такой как переключатели димеризации, описанные, например, в WO2014127261, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Дополнительное описание и иллюстративные

конфигурации таких регулируемых CAR представлены в настоящем описании и, например, в абзацах 527-551 международной публикации № WO 2015/090229, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления RCAR вовлекает домен переключения, например, домен переключения FKBP, как указано в SEQ ID NO: 92, или содержит фрагмент FKBP, обладающий способностью связываться с FRB, например, как указано в SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления RCAR вовлекает домен переключения, содержащий последовательность FRB, например, как указано в SEQ ID NO: 94, или мутантную последовательность FRB, например, как указано в любой из SEQ ID NO: 95-100.

#### **Совместная экспрессия CAR рецептором хемокинов**

В некоторых вариантах осуществления CAR-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем описании, дополнительно содержит молекулу рецептора хемокинов. Трансгенная экспрессия рецепторов хемокинов CCR2b или CXCR2 в Т-клетках повышает транспорт в CCL2- или CXCL1-секретирующие солидные опухоли, в том числе меланому и нейробластому (Craddock et al., *J Immunother.* 2010 Oct; 33(8):780-8 и Kershaw et al., *Hum Gene Ther.* 2002 Nov 1; 13(16): 1971-80). Таким образом, без связи с теорией, полагают, что рецепторы хемокинов, экспрессируемые в CAR-экспрессирующих клетках, которые распознают хемокины, секретируемые опухолями, например, солидными опухолями, могут повысить хоминг CAR-экспрессирующих клеток в опухоли, облегчить инфильтрацию CAR-экспрессирующих клеток в опухоль и усилить противоопухолевую эффективность CAR-экспрессирующей клетки. Молекула рецептора хемокинов может включать встречающийся в природе или рекомбинантный рецептор хемокинов или его хемокин-связывающий фрагмент. Молекула рецептора хемокинов, пригодная для экспрессии в CAR-экспрессирующей клетке, описанной в настоящем описании, включает рецептор CXС-хемокинов (например, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6 или CXCR7), рецептор СС-хемокинов (например, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 или CCR11), рецептор CX3С-хемокинов (например, CX3CR1), рецептор ХС-хемокинов (например, XCR1) или их хемокин-связывающий фрагмент. В одном варианте осуществления молекула рецептора хемокинов, подлежащая экспрессии с CAR, описанным в настоящем описании, выбрана, исходя из хемокина(ов), секретируемого опухолью. В одном варианте осуществления CAR-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем описании, дополнительно содержит, например, экспрессирует, рецептор CCR2b или рецептор CXCR2. В одном варианте осуществления CAR, описанный в настоящем описании, и молекула рецептора хемокинов находятся на одном векторе или на двух различных векторах. В некоторых вариантах осуществления, в которых CAR, описанный в настоящем описании, и молекула рецептора хемокинов находятся на одном векторе, каждый из CAR и молекулы рецептора хемокинов находится под контролем двух различных промоторов или под контролем одного и того же промотора.

#### **Расщепленный CAR**

В некоторых вариантах осуществления в CAR-экспрессирующих клетках используется расщепленный CAR. Подход расщепленных CAR более подробно описан в публикациях WO2014/055442 и WO2014/055657. В кратком изложении, система расщепленного CAR включает клетку, экспрессирующую первый CAR, обладающий первым антигенсвязывающим доменом и костимулирующим доменом (например, 41BB), и клетка также экспрессирует второй CAR, обладающий вторым антигенсвязывающим доменом и внутриклеточным сигнальным доменом (например, CD3-зета). Когда клетка

встречает первый антиген, костимулирующий домен активируется, и клетка пролиферирует. Когда клетка встречает второй антиген, внутриклеточный сигнальный домен активируется и начинается активность уничтожения клеток. Таким образом, CAR-экспрессирующая клетка полностью активируется в присутствии обоих антигенов.

#### 5 **Фармацевтические композиции и способы лечения**

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать CAR-экспрессирующую клетку, например, множество CAR-экспрессирующих клеток, как описано в настоящем описании, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или  
10 эксципиентами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как EDTA или глутатион; адьюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты.  
15 Композиции могут быть составлены, например, для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить способом, пригодным для заболевания, подлежащего лечению (или предупреждению). Количество и частота введений будут определяться такими факторами, как состояние пациента и тип и тяжесть заболевания пациента, хотя подходящие дозировки могут быть определены  
20 в клинических испытаниях.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу свободна от примесей, например, отсутствуют поддающиеся обнаружению уровни примесей, например, примесей, описанных в абзаце 1009 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве  
25 ссылки в полном объеме.

Когда указано "иммунологически эффективное количество", "эффективное против злокачественной опухоли количество", "ингибирующее злокачественную опухоль эффективное количество" или "терапевтическое количество" точное количество композиций по настоящему изобретению, подлежащее введению, может определять  
30 врач с учетом индивидуальных отличий возраста, массы тела, размера опухоли, степени инфекции или метастазирования, и состояния пациента (индивидуума). Как правило, можно утверждать, что фармацевтическую композицию, содержащую иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки), описанные в настоящем описании, можно вводить в дозировке от  $10^4$  до  $10^9$  клеток/кг массы тела, в некоторых случаях  
35 от  $10^5$  до  $10^6$  клеток/кг массы тела, включая все целые числа в этих диапазонах. Композиции иммунных эффекторных клеток также можно вводить многократно в этих дозировках. Клетки можно вводить с использованием способов инфузии, которые хорошо известны при иммунотерапии (см., например, Rosenberg *et al.*, New Eng. J. of  
40 Med. 319:1676, 1988).

В некоторых вариантах осуществления адоза клеток с CAR (например, клеток с CAR против CD19) составляет приблизительно  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза клеток с CAR (например, клеток с CAR против CD19) составляет  
45 по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ , или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза клеток с CAR (например, клеток с CAR против CD19) составляет вплоть до

приблизительно  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза клеток с CAR (например, клеток с CAR против CD19) составляет приблизительно  $1,1 \times 10^6$ – $1,8 \times 10^7$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза клеток с CAR (например, клеток с CAR против CD19) составляет приблизительно  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$  или  $5 \times 10^9$  клеток. В некоторых вариантах осуществления доза клеток с CAR (например, клеток с CAR против CD19) составляет по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ , или  $5 \times 10^9$  клеток. В некоторых вариантах осуществления доза клеток с CAR (например, клеток с CAR против CD19) составляет вплоть до приблизительно  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$  или  $5 \times 10^9$  клеток.

В некоторых аспектах может быть желательным введение активированных иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) индивидууму, а затем впоследствии повторное взятие крови (или проведение афереза), активация иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) из нее в соответствии с настоящим изобретением, и повторная инфузия пациенту активированных и увеличенных в количестве иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток). Этот процесс можно проводить многократно каждые несколько недель. В некоторых аспектах иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки) можно активировать из крови, взятой в объеме от  $10 \text{ см}^3$  до  $400 \text{ см}^3$ . В некоторых аспектах иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки) активируют из крови, взятой в объеме  $20 \text{ см}^3$ ,  $30 \text{ см}^3$ ,  $40 \text{ см}^3$ ,  $50 \text{ см}^3$ ,  $60 \text{ см}^3$ ,  $70 \text{ см}^3$ ,  $80 \text{ см}^3$ ,  $90 \text{ см}^3$  или  $100 \text{ см}^3$ .

Введение рассматриваемых композиций можно проводить любым удобным способом, включая ингаляцию аэрозоля, инъекцию, прием внутрь, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в настоящем описании, можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, внутривожно, внутрь опухоли, внутрь лимфоузла, внутрь костного мозга, внутримышечно, посредством внутривенной (в/в) инъекции или внутривенно. В одном аспекте композиции Т-клеток, описанные в настоящем описании, вводят пациенту посредством внутривожной или подкожной инъекции. В одном аспекте композиции Т-клеток, описанные в настоящем описании, вводят посредством в/в инъекции. Композиции иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) можно инъектировать прямо в опухоль, лимфатический узел или в область инфекции.

В конкретном иллюстративном аспекте индивидуумов можно подвергать лейкоаферезу, где лейкоциты собирают, увеличивают в количестве или истощают *ex vivo* для селекции и/или выделения представляющих интерес клеток, например, Т-клеток. Эти выделенные Т-клетки можно увеличивать в количестве способами, известными в данной области, и обрабатывать так, чтобы можно было вводить одну или несколько конструкций CAR, описанных в настоящем описании, тем самым, создавая CAR Т-клетку по настоящему изобретению. Индивидуумов, нуждающихся в этом, можно впоследствии подвергать стандартному лечению химиотерапией в высокой дозе с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых аспектах после или одновременно с трансплантацией индивидуумам проводят инфузию увеличенных в количестве CAR Т-клеток, описанных в настоящем описании. В дополнительном аспекте увеличенные в количестве клетки вводят до или после

хирургической операции.

Дозировка описанных выше лекарственных средств, подлежащая введению пациенту, варьируется в зависимости от точной природы состояния, подвергаемого лечению, и реципиента лечения. Увеличение дозировок в масштабе для введения человеку можно  
5 проводить в соответствии с принятой в данной области практикой. Доза САМРАТН, например, как правило, находится в диапазоне от 1 до приблизительно 100 мг для  
взрослого пациента, обычно вводимых в течение периода от 1 до 30 суток. Подходящая  
суточная доза составляет от 1 до 10 мг в сутки, хотя в некоторых случаях можно  
использовать более высокие дозы вплоть до 40 мг в сутки (как описано в патенте США  
10 № 6120766).

В одном варианте осуществления CAR вводят в иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки), например, с использованием транскрипции *in vitro*, и индивидууму (например, человеку) проводят первоначальное введение иммунных  
15 эффекторных клеток с CAR (например, Т-клеток, НК-клеток) по изобретению, и одно или несколько последующих введений иммунных эффекторных клеток с CAR (например, Т-клеток, НК-клеток), где одно или несколько последующих введений проводят в течение менее чем 15 суток, например 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 суток, после предшествующего введения. В одном варианте осуществления индивидууму (например, человеку) проводят более одного введения иммунных эффекторных клеток с CAR  
20 (например, Т-клеток, НК-клеток) по изобретению в неделю, например, проводят 2, 3 или 4 введений иммунных эффекторных клеток с CAR (например, Т-клеток, НК-клеток) по изобретению в неделю. В одном варианте осуществления индивидууму (например, человек) проводят более одного введения иммунных эффекторных клеток с CAR (например, Т-клеток, НК-клеток) в неделю (например, 2, 3 или 4 введений в неделю)  
25 (также называемых в настоящем описании курсом), за которыми следует неделя без введения иммунных эффекторных клеток с CAR (например, Т-клеток, НК-клеток), а затем индивидууму проводят одно или несколько дополнительных введений иммунных эффекторных клеток с CAR (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, более одного введения иммунных эффекторных клеток с CAR (например, Т-клеток, НК-клеток) в  
30 неделю). В другом варианте осуществления у индивидуума (например, человека) проводят более одного курса введения иммунных эффекторных клеток с CAR (например, Т-клеток, НК-клеток), и время между курсами в каждом случае составляет менее 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 суток. В одном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки с CAR (например, Т-клетки, НК-клетки) вводят раз в двое суток на протяжении 3  
35 введений в неделю. В одном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки с CAR (например, Т-клетки, НК-клетки) по изобретению вводят в течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель.

В одном аспекте CAR-экспрессирующие клетки (например, Т-клетки, НК-клетки), как описано в настоящем описании, например, такие как клетки, экспрессирующие  
40 CAR против CD19, например, CTL019, получают с использованием вирусных векторов, таких как лентивирус. Экспрессирующие CAR клетки, полученные таким образом, могут иметь стабильную экспрессию CAR.

В одном аспекте экспрессирующие CAR клетки (например, Т-клетки, НК-клетки) временно экспрессируют векторы CAR в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 суток  
45 после трансдукции. Временной экспрессии CAR можно достигать посредством доставки РНК-вектора с CAR. В одном аспекте РНК CAR трансдуцируют в Т-клетку посредством электропорации.

Потенциальной проблемой, которая может возникать у пациентов, подвергаемых



лечению с использованием клеток с временной экспрессией CAR, например, Т-клеток (в частности, клеток, экспрессирующих CAR, содержащих scFv мыши (например, Т-клеток, НК-клеток)), является анафилаксия после многократных введений.

Без связи с теорией, полагают, что такой анафилактический ответ может быть вызван развитием у пациента гуморального ответа против CAR, т.е. антител против CAR, имеющих анти-IgE изотип. Считается, что антителопродуцирующие клетки пациента претерпевают переключение класса с изотипа IgG (который не вызывает анафилаксию) на изотип IgE, когда существует период перерыва в воздействии антигена, составляющий от десяти до четырнадцати суток.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов, способ, кроме того, включает введение одной или нескольких доз клеток (например, иммунных клеток, содержащих нуклеиновую кислоту CAR или полипептид CAR, как описано в настоящем описании), млекопитающему (например, млекопитающему, имеющему злокачественную опухоль, например, млекопитающему, который является или идентифицирован как являющийся отвечающим индивидуумом, полностью отвечающим индивидуумом, частично отвечающим индивидуумом, не отвечающим индивидуумом, индивидуумом, у которого возникнет рецидив, или индивидуумом, у которого не возникнет рецидива, в соответствии со способами, описанными в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько доз клеток CAR (например, клеток с CAR против CD19) содержат по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$  или  $5 \times 10^9$  клеток.

В одном варианте осуществления вводят вплоть до 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 доз клеток. В других вариантах осуществления млекопитающему вводят одну, две, три, четыре, пять или 6 доз клеток, например, за интервал лечения, составляющий одну, две, три, четыре или более недель. В одном варианте осуществления вводят вплоть до 6 доз в течение двух недель. Дозы могут быть одинаковыми или могут различаться. В одном варианте осуществления сначала вводят более низкую дозу, а затем одну или несколько более высоких доз. В одном иллюстративном варианте осуществления более низкая доза составляет приблизительно от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^9$  клеток/кг, или от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  клеток/кг; и более высокая доза составляет приблизительно от  $2 \times 10^5$  до  $2 \times 10^9$  клеток/кг или от  $2 \times 10^6$  до  $2 \times 10^8$  клеток/кг, за которой следуют 3-6 доз, составляющих приблизительно от  $4 \times 10^5$  до  $4 \times 10^9$  клеток/кг или от  $4 \times 10^6$  до  $4 \times 10^8$  клеток/кг.

В одном варианте осуществления одну или несколько доз клеток вводят после одного или нескольких истощающих лимфоциты способов терапии, например, после истощающей лимфоциты химиотерапии. В одном варианте осуществления истощающая лимфоциты терапия включает химиотерапию (например, циклофосфамид).

В одном варианте осуществления после одной или нескольких доз следует трансплантация клеток, например, трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Например, трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток происходит через от приблизительно 20 до приблизительно 35 суток, например, приблизительно от 23 до 33 суток.

#### **Способы доставки с помощью биополимеров**

В некоторых вариантах осуществления одну или несколько CAR-экспрессирующих клеток, как описано в настоящем описании, можно вводить или доставлять индивидууму с помощью биополимерного каркаса, например, биополимерного имплантата. Биополимерные каркасы могут поддерживать или повышать доставку, увеличение в

количестве и/или распределение CAR-экспрессирующих клеток, описанных в настоящем описании. Биополимерный каркас содержит биосовместимый (например, по существу не индуцирует воспалительный или иммунный ответ) и/или биodeградируемый полимер, который может быть встречающимся в природе или синтетическим. Иллюстративные биополимеры описаны, например, в абзацах 1004-1006 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

#### **Иллюстративная компьютерная система**

Различные компьютерные системы могут быть специально настроены для обработки выдаваемой информации в отношении потенциальных индикаторов статуса ответа на злокачественную опухоль (например, индикатор статуса ответа на ALL и CLL, как описано в настоящем описании, например, такой как полностью отвечающий, частично отвечающий, не отвечающий). В некоторых вариантах осуществления компьютерная система может определять и предоставлять информацию об уровне достоверности, ассоциированном с различными биомаркерами и/или индикаторами злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли), такой как ALL и CLL. Например, компьютерные системы могут оценивать то, указывает ли тест, проведенный для индивидуума, на генную сигнатуру полностью отвечающего, частично отвечающего или не отвечающего индивидуума, а также степень достоверности, ассоциированную с классификацией ответа индивидуума. В следующих примерах система может обеспечить указание и/или рекомендацию об увеличении степени достоверности, ассоциированной со спрогнозированной классификацией ответа. Например, система может быть настроена для оценки любых тестов и исследованных биомаркеров и/или индикаторов злокачественной опухоли, которые были проведены для индивидуума, против другой характеристики, идентифицированной как независимая и/или аддитивная для существующих данных. В одном варианте осуществления система может быть настроена для оценки любых тестов и исследуемых биомаркеров и/или индикаторов злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как CLL и ALL), которые проводили для индивидуума против другой характеристики, идентифицированной как независимая и/или аддитивная для существующих данных. Система может определять, когда дополнительный биомаркер и/или индикатор (например, генная сигнатура) может увеличивать достоверность, ассоциированную, например, с изменением классификации ответа. Соответственно, система может рекомендовать исследование любой идентифицированной характеристики.

В некоторых вариантах осуществления может быть предоставлена интерактивная система для идентификации, оценки и/или лечения индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как ALL и CLL). В одном варианте осуществления может быть предоставлена интерактивная система для идентификации, оценки и/или лечения индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, гематологическую злокачественную опухоль, такую как ALL и CLL). Согласно одному варианту осуществления система может быть настроена для приема входных данных пользователя в зависимости от степени достоверности оценки индивидуума. После введения степени достоверности для пользователя система может определять исследуемые характеристики для включения в модель оценки. В одном примере система включает спецификацию независимых индикаторов активности заболевания в популяции индивидуумов (например, пациентов). Система может быть настроена для оценки степени достоверности при определении

активности заболевания или прогнозировании будущей активности заболевания на основе того, какие используют независимые индикаторы. Кроме того, система может быть настроена для определения и/или рекомендации различных комбинаций определенных независимых показателей для повышения степени достоверности при

5

оценке.

В соответствии с другим аспектом, компьютерная система может быть специально настроена для оценки индикаторов злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL). В одном варианте осуществления компьютерная система может быть специально настроена для оценки

индикаторов ALL и/или CLL. Система может быть настроена для создания многомерной модели, где многомерная модель исключает коррелирующие индикаторы. В некоторых примерах система может быть настроена для идентификации коррелирующих индикаторов после оценки выданных результатов теста для популяции индивидуумов (например, пациентов), имеющей один или несколько индикаторов. Например, система может выполнять анализ регрессионной модели для контроля различных параметров, включая, например, возраст, расу, пол индивидуума и наличие других индикаторов. После устранения коррелирующих индикаторов система создает модель из одного или нескольких независимых индикаторов. В некоторых вариантах осуществления система может быть настроена для выбора различных комбинаций из одного или нескольких независимых индикаторов и может далее проводить оценку (включая, например, прямую оценку комбинации) для предоставления информации об уровне достоверности, ассоциированном с соответствующим выбором. Выбранные системой модели можно использовать для создания ожидаемого изменения активности заболевания с заданным уровнем достоверности.

10

15

20

25

В одном варианте осуществления изобретение относится к системе для оценки злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) у индивидуума, включающей:

по меньшей мере один процессор, функционально подсоединенный к памяти, причем по меньшей мере один процессор во время работы настроен на:

30

получение величины статуса ответа, которая включает показатель сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток) и комбинации одного или нескольких из: биомаркера, приведенного в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCF20, IF-17а и/или IF-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, биомаркера CD27 биомаркера, биомаркера CD45RO, биомаркера PD-1, биомаркера FAG-3, биомаркера TIM-3, биомаркера IL2RA, биомаркера IF21, биомаркера CD4, биомаркера CD8, сигнатуры набора генов TH1+ Т-хелперных клеток, сигнатуры набора генов TH2+ Т-хелперных клеток, и сигнатуры набора генов Т-клеток памяти (например, CD8+ Т-клеток памяти, например, наивных Т-клеток ( $T_N$ ), например, стволовых клеток памяти ( $T_{SCM}$ ), например, центральных Т-клеток памяти ( $T_{CM}$ ), например, эффекторных Т-клеток памяти ( $T_{EM}$ )); и

35

40

после определения величины статуса ответа проведение одного, двух, трех или более из:

45

идентификации индивидуума как полностью отвечающего, частично отвечающего или не отвечающего индивидуума;

рекомендации терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19

(например, Т-клетками, НК-клетками), как описано в настоящем описании, например, такой как STF019);

рекомендации выбора или изменения дозирования при терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками); или альтернативной терапии, например, стандартной терапии конкретной злокачественной опухоли.

В одном варианте осуществления изобретение относится к системе для оценки злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) у индивидуума, включающей: по меньшей мере один процессор, функционально подсоединенный к памяти, причем по меньшей мере один процессор во время работы настроен на: получение величины статуса ответа, которая включает показатель сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток) и комбинации одного или нескольких из: биомаркера, приведенного в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, таблице 15, таблице 16 (например, CCL20, IL-17а и/или IL-6), таблице 17, таблице 18, таблице 20, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L и KLRG1; и после определения величины статуса ответ проведение одного, двух, трех, четырех или более из: идентификации индивидуума как полностью отвечающего, частично отвечающего или не отвечающего; рекомендации терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, как описано в настоящем описании, например, такими STL019); рекомендации выбора или изменения дозирования при терапии CAR-экспрессирующими клетками; или альтернативной терапии.

На фиг.16 представлена блок-схема распределенной компьютерной системы 200, с помощью которой можно применять на практике различные аспекты и функции в соответствии с настоящим изобретением. Распределенная компьютерная система 200 может включать одну или несколько компьютерных систем. Например, как проиллюстрировано, распределенная компьютерная система 200 включает три компьютерных системы: 202, 204 и 206. Как показано, компьютерные системы 202, 204 и 206 взаимно соединены и могут обмениваться данными через коммуникационную сеть 208. Сеть 208 может включать любую коммуникационную сеть, через которую компьютерные системы могут обмениваться данными. Для обмена данными через сеть 208, компьютерные системы 202, 204 и 206 и сеть 208 могут использовать различные способы, протоколы и стандарты, включая, среди прочих, кольцевую сеть с эстафетным доступом, Ethernet, беспроводную сеть Ethernet, Bluetooth, передачу радиосигнала, передачу инфракрасного сигнала, TCP/IP, UDP, HTTP, FTP, SNMP, SMS, MMS, SS2, JSON, XML, REST, SOAP, CORBA НОР, RMI, DCOM и интернет-службы.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, функции и действия, обсуждаемые для идентификации, лечения или предупреждения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) у индивидуума могут выполняться на компьютерных системах 202, 204 и 206 индивидуально и/или в комбинации. Например, компьютерные системы 202, 204 и 206 поддерживают, например, участие в объединенных операциях, которые могут включать анализ данных о лечении, полученных для популяции пациентов. В одной альтернативе одна компьютерная система (например, 202) может анализировать данные о лечении, полученные для популяции индивидуумов (например, пациентом) для разработки моделей охарактеризации и/или идентификации независимых индикаторов активности заболевания. Компьютерные системы 202, 204 и 206 могут включать персональные

вычислительные устройства, такие как сотовые телефоны, смартфоны, планшеты и т.д., и также могут включать настольные компьютеры, портативные компьютеры и т.д.

5       Различные аспекты и функции в соответствии с настоящим изобретением могут быть выполнены в качестве специализированного аппаратного оборудования или программного обеспечения, работающих в одной или нескольких компьютерных системах, включая компьютерную систему 202, показанную на фиг.16. В одном варианте осуществления компьютерная система 202 представляет собой вычислительное устройство, специально настроенное для выполнения процессов и/или операций, 10 рассмотренных выше. Например, система может предоставлять пользовательский интерфейс конечным пользователям, который предоставляет информацию о лечении, диагностическую информацию и уровни достоверности, ассоциированные с биомаркерами и/или генетическими индикаторами, среди других возможностей. Как представлено, компьютерная система 202 включает по меньшей мере один процессор 15 210 (например, одноядерный или многоядерный процессор), память 212, шину 214, интерфейсы ввода/вывода (например, 216) и хранилище 218. Процессор 210, может включать один или несколько микропроцессоров или других типов контроллеров и может выполнять серию инструкций, которые манипулируют данными (например, данные о лечении, данные о тестировании и т.д.). Как показано, процессор 210 20 подсоединен к другим компонентам системы, включая память 212, через соединительный элемент (например, шину 214).

      Память 212 и/или хранилище 218 можно использовать для хранения программ и данных в процессе работы компьютерной системы 202. Например, память 212 может представлять собой относительно высокоэффективную, изменяемую, память с 25 произвольным доступом, такую как динамическая память с произвольным доступом (DRAM) или статическая память (SRAM). Кроме того, память 212 может включать любое устройство для хранения данных, такое как дисковод или другое энергонезависимое запоминающее устройство схема, такое как флэш-память, твердотельная память или память на фазовых переходах (PCM). В следующих вариантах 30 осуществления функции и операции, обсуждаемые в отношении идентификации, лечения или предупреждения злокачественной опухоли (например, ALL и/или CLL) у индивидуума могут быть выполнены в приложении, которое выполняется компьютерной системой 202 с памяти 212 и/или хранилища 218.

      Компьютерная система 202 также включает один или несколько интерфейсов 216, 35 таких как устройства ввода, устройства вывода, и комбинированные устройства ввода/вывода. Интерфейсы 216 могут принимать входную информацию, выводить выходную информацию, или осуществлять оба этих действия. Хранилище 218 может включать считываемый компьютером и записываемый компьютером энергонезависимый 40 запоминающий носитель, на котором хранятся инструкции, которые определяют программу, выполняемую процессором. Хранилище 218 также может включать информацию, которая записывается на или в носителе, и эта информация может обрабатываться приложением. Носитель, который можно использовать с различными вариантами осуществления, может включать, например, оптический диск, магнитный диск или флэш-память, SSD, среди прочих.

45       Кроме того, изобретение не ограничивается конкретной запоминающей системой или хранилищем. Хотя компьютерная система 202 представлена только в качестве примера в качестве одного типа компьютерной системы, на которой можно применять на практике различные функции для идентификации, лечения или предупреждения

злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) у индивидуума, аспекты изобретения не ограничиваются исполнением на компьютерной системе, представленной на фиг.16. Различные аспекты и функции в соответствии с настоящим изобретением можно применять на практике на одном или нескольких компьютерах, имеющих архитектуру или компоненты, отличающиеся от тех, что показаны на фиг.16.

В некоторых вариантах осуществления компьютерная система 202 может включать операционную систему, которая управляет по меньшей мере частью аппаратных компонентов (например, устройствами ввода/вывода, сенсорными панелями, камерами и т.д.), включенными в компьютерную систему 202. Один или несколько процессоров или контроллеров, таких как процессор 210, могут приводить в исполнение операционную систему, которая может представлять собой, среди прочих, операционную систему на основе Windows (например, Windows NT, ME, XP, Vista, 2, 8 или RT), доступную от Microsoft Corporation, операционную систему, доступную от Apple Computer (например, MAC OS, в том числе System X), один из множества выпусков операционных систем на основе Linux (например, операционная система Enterprise Linux, доступная от Red Hat Inc.), операционную систему Solaris, доступную от Sun Microsystems, или операционную систему UNIX, доступную из различных источников. Можно использовать многие другие операционные системы, в том числе операционные системы, разработанные для персональных вычислительных устройств (например, iOS, Android и т.д.), и варианты осуществления не ограничиваются какой-либо конкретной операционной системой.

Согласно одному варианту осуществления, процессор и операционная система вместе определяют компьютерную платформу, на которой могут выполняться приложения. Кроме того, различные функции для идентификации, лечения или предупреждения злокачественной опухоли (например, гематологической злокачественной опухоли, такой как ALL и CLL) у индивидуума могут быть осуществлены в непрограммной среде (например, документы, созданные в HTML, XML или другом формате, который при просмотре в окне программы браузера, обеспечивает аспекты графического интерфейса пользователя или выполнение других функций). Кроме того, различные варианты осуществления в соответствии с аспектами настоящего изобретения могут быть осуществлены в качестве программных или непрограммных компонентов, или любой их комбинации. Таким образом, изобретение не ограничивается конкретным языком программирования, и также можно использовать любой подходящий язык программирования.

### ПРИМЕРЫ

Далее изобретение подробно описано с помощью следующих экспериментальных примеров. Эти примеры предоставлены только для целей иллюстрации и не подразумевается, что они являются ограничивающими, если нет иных указаний. Таким образом, изобретение никоим образом не следует истолковывать как ограниченное следующими примерами, а скорее его следует истолковывать как охватывающее любые и все вариации, которые станут очевидными благодаря указаниям, представленным в настоящем описании.

Без дальнейшего описания полагают, что специалист в данной области может с использованием предшествующего описания и следующих ниже иллюстративных примеров получать и использовать соединения по настоящему изобретению и применять на практике заявленные способы. Представленные ниже рабочие примеры конкретно указывают на различные аспекты настоящего изобретения, и их не следует считать

ограничивающими каким-либо образом остальную часть описания.

**Пример 1: Идентификация новых транскрипционных генных сигнатур, которые прогнозируют ответ индивидуума на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, при хроническом лимфоидном лейкозе (CLL) и остром лимфобластном лейкозе (ALL) с использованием полногеномного RNAseq и несмещенной селекции признаков**

В данном примере описана идентификация новых транскрипционных генных сигнатур, которые прогнозируют ответ пациента на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапию CTL019) при хроническом лимфоидном лейкозе (CLL) и остром лимфобластном лейкозе (ALL) для применения в соответствии с настоящим изобретением.

Среди прочего, в настоящем примере описаны новые генные сигнатуры на основе уровней экспрессии мРНК выбранных генов в образцах, полученных посредством афереза, и образцах произведенного продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, CTL019) перед реинфузией.

В частности, в настоящем примере описаны способы несмещенной селекции признаков для открытия новых генных сигнатур, которые прогнозируют ответ пациента на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, CTL019) при CLL и ALL, для применения в соответствии с настоящим изобретением.

Были идентифицированы новые генные сигнатуры на основе уровней экспрессии мРНК в образцах, полученных посредством афереза, и образцах произведенного продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19, перед реинфузией, которые прогнозируют ответ пациента на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, при хроническом лимфоидном лейкозе (CLL) и остром лимфобластном лейкозе (ALL). Идентифицированные сигнатуры также были обнаружены в исследовании с полногеномным RNAseq в образцах произведенного продукта, которые включали 7 образцов индивидуумов с ALL и 21 образец индивидуумов с CLL. Образцы индивидуумов с ALL (всего 7) брали от индивидуумов (например, пациентов) с полным ответом на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19. Образцы индивидуумов с CLL (всего 21) стратифицировали следующим образом: биологические образцы получали от 2 пациентов, которые были полностью отвечающими (CR) на терапию CTL019, 6 пациентов, которые были частично отвечающими (PR), и 13 не отвечающих индивидуумов (NR). Затем генные сигнатуры исследовали в подгруппе описанных выше пациентов, где образцы были получены при аферезе. Было выявлено несколько генных сигнатур, отличающих отвечающих индивидуумов от не отвечающих индивидуумов, в образцах произведенного продукта и образцах, полученных посредством афереза, и они описаны далее в примере 2. Образцы произведенного продукта здоровых доноров (т.е. эталонные образцы) получали и использовали в качестве уровня для сравнения.

Затем были обнаружены новые генные сигнатуры с использованием различных аналитических подходов: 1) несмещенная селекция признаков; 2) анализ набора генов; и 3) дифференциальный анализ экспрессии выбранных представляющих интерес генов. Анализ набора генов (2) и дифференциальный анализ экспрессии (3) рассмотрены более подробно в примере 2.

Новые сигнатуры генов, полученные в результате несмещенной селекции признаков, были открыты путем определения того, какие гены дифференциально экспрессировались между CR и NR и между CR и PR. Гены определяли как дифференциально экспрессируемые, если их дифференциальная экспрессия имела статистически значимое отличие с пороговым значением  $p$  FDR 0,1. Перечень генов для сравнения CR и NR ( $N=$

128) и CR и PR (N=34) приведен в таблице 1А-В.

Без связи с конкретной теорией, эти данные указывают на то, что состояние дифференцировки Т-клеток в образце, полученном посредством афереза, или образце продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, STF019) коррелирует с ответом индивидуума (т.е. CR, PR или NR). Генные сигнатуры для Т-клеток от CR соответствуют более нестимулированному/ недифференцированному состоянию. Кроме того, содержание подгрупп Т-клеток памяти является различным между CR и NR, причем CR демонстрируют сходство с наивными Т-клетками ( $T_N$ ) и стволовыми Т-клетками памяти ( $T_{SCM}$ ). Иллюстративная схема, иллюстрирующая прогрессирование стадий подгрупп от наивных Т-клеток ( $T_N$ ) через Т-клетки памяти в эффекторные Т-клетки памяти ( $T_{EM}$ ), представлена на фиг.3.

Полностью отвечающие на терапию STF019 индивидуумы имеют значительно более высокий % CD8+ Т-клеток, которые экспрессируют костимулирующую молекулу CD27, но лишены маркера обученных антигеном Т-клеток CD45RO, по сравнению с не отвечающими индивидуумами. В одном варианте осуществления пороговым уровнем для этого различия было 7% CD27+ CD45RO- клеток в популяции CD8+. В одном варианте осуществления полностью отвечающего индивидуума определяют как 7% или более CD27+ CD45RO- клеток в популяции CD8+. Без связи с конкретной теорией, состояние Т-клеток памяти в образцах STF019, вероятно, является основным компонентом ответа (фиг.3).

Эти данные демонстрируют, что CR в большей мере имеют покоящиеся клетки  $T_{EFF}$ , покоящиеся клетки  $T_{REG}$ , наивные CD4-клетки, нестимулированные и ранние Т-клетки памяти, в то время как NR в большей степени имеют активированные клетки  $T_{EFF}$ , активированные клетки  $T_{REG}$ , активированные клетки TH1 и TH2, стимулированные клетки памяти и поздние Т-клетки памяти.

Таблица 1А: Сравнение полностью отвечающих (CR) не отвечающих (NR) индивидуумов

Ген	Unigene	Номер доступа	FDR
C16orf74	Hs.461655	NM_206967	6,47E-05
uc021охm			1,67E-03
uc021ygq			2,83E-03
uc021охр			3,31E-03
SNED1	Hs.471834	NM_001080437	9,55E-03
ADAM 19	Hs.483944	NM_033274	1,34E-02
FAIM2	Hs.567424	NM_012306	1,82E-02
WHAMMP2			1,82E-02
LOC730091	Hs.659905		1,84E-02
TCF7	Hs.573153	NM_201633, NM_201632, NM_001134851, NM_001134852, NM_213648, NM_003202, NM_201634	1,84E-02
TTL2	Hs.520554	NM_031949	1,84E-02
LY9	Hs.403857	NM_002348, NM_001033667	2,03E-02
uc021tnc			2,13E-02
TRIL	Hs.21572	NM_014817	2,28E-02
uc004crn			2,28E-02
DPEP2	Hs.372633	NM_022355	2,28E-02
GZMB	Hs.1051	NM_004131	2,35E-02
FAM102A	Hs.568044	NM_203305, NM_001035254	2,35E-02
ALS2CL	Hs.517937	NM_147129	2,35E-02



	EPHA4	Hs.371218	NM_004438	2,35E-02
	IKBIP	Hs.252543	NM_201612, NM_201613, NM_153687	2,88E-02
	HBEGF	Hs.799	NM_001945	2,88E-02
	LHFPL3	Hs.659164	NM_199000	2,88E-02
5	RCAN2	Hs.440168	NM_005822	2,97E-02
	MFGE8	Hs.3745	NM_005928, NM_001114614	2,97E-02
	IL24	Hs.723317, Hs.58831	NM_006850, NM_181339	2,97E-02
	FAIM3	Hs.723317, Hs.58831	NM_001142472, NM_001142473, NM_005449	2,97E-02
	CDKN1B	Hs.238990	NM_004064	2,99E-02
10	AQP3	Hs.234642	NM_004925	3,06E-02
	GPR155	Hs.516604	NM_001033045, NM_152529	3,06E-02
	HS6ST2	Hs.385956	NM_147175, NM_001077188	3,25E-02
	SNORD85			3,25E-02
	uc022cci			3,25E-02
	GSTM1	Hs.301961	NM_000561, NM_146421	3,27E-02
	VSIG1	Hs.177164	NM_001170553, NM_182607	3,86E-02
15	VIPR1	Hs.348500	NM_004624	3,86E-02
	RCAN3	Hs.656799	NM_013441	4,45E-02
	ADHFE1	Hs.720023	NM_144650	4,49E-02
	HSPH1	Hs.36927	NM_006644	4,62E-02
	ENPP6	Hs.297814	NM_153343	4,74E-02
20	RORC	Hs.607993, Hs.256022	NM_005060, NM_001001523	4,83E-02
	TRIB2	Hs.627749, Hs.467751	NM_021643	4,96E-02
	LRP8	Hs.576154	NM_001018054, NM_004631, NM_033300, NM_017522	4,96E-02
	RGS17	Hs.166313	NM_012419	5,05E-02
	TAAR3	Hs.679662		5,18E-02
25	C5orf41	Hs.484195	NM_153607, NM_001168394, NM_001168393	5,27E-02
	MIR3183			5,27E-02
	LTA	Hs.36	NM_001159740, NM_000595	5,27E-02
	KLHL24	Hs.407709	NM_017644	5,28E-02
	PIK3IP1	Hs.26670	NM_001135911, NM_052880	5,28E-02
30	MAP3K1	Hs.653654	NM_005921	5,29E-02
	VWC2L	Hs.534834	NM_001080500	5,29E-02
	IDI2-AS1			5,29E-02
	DUSP4	Hs.417962	NM_001394, NM_057158	5,29E-02
	SKIL	Hs.581632	NM_001145098, NM_001145097, NM_005414	5,77E-02
35	uc021oxf			5,86E-02
	AMICA1	Hs.16291	NM_153206, NM_001098526	5,86E-02
	TP53INP1	Hs.492261	NM_001135733, NM_033285	5,86E-02
	GDAP1L1	Hs.517059	NM_024034	6,00E-02
	HK2	Hs.591588, Hs.406266	NM_000189	6,43E-02
	CBL1	Hs.592271	NM_024814	6,44E-02
40	PSD3	Hs.434255	NM_015310, NM_206909	6,44E-02
	PUS7	Hs.520619	NM_019042	6,44E-02
	MSMO1			6,63E-02
	IDI1	Hs.283652	NM_004508	6,63E-02
	HRH4	Hs.287388	NM_001160166, NM_021624, NM_001143828	6,73E-02
	FAM19A1	Hs.655061	NM_213609	6,73E-02
45	EHD4	Hs.143703	NM_139265	6,73E-02
	PVR	Hs.171844	NM_001135768, NM_006505, NM_001135770, NM_001135769	6,74E-02
	MIR1293			6,74E-02
	WDR64	Hs.723441	NM_144625	6,74E-02
	CDKN1A	Hs.370771	NM_078467, NM_000389	6,74E-02

	CACNA1I	Hs.125116	NM_021096, NM_001003406	6,75E-02
	C21orf63	Hs.208358	NM_058187	6,75E-02
	FLJ41649	Hs.654837		9,72E-02
	MPP7	Hs.499159	NM_173496	9,82E-02
5	POP1	Hs.252828	NM_001145861, NM_001145860, NM_015029	9,82E-02
	CALCOCO1	Hs.156667	NM_020898, NM_001143682	9,82E-02
	COL5A3	Hs.235368	NM_015719	9,82E-02
	LHFP	Hs.507798	NM_005780	9,82E-02
	CTSO	Hs.75262	NM_001334	9,82E-02
10	LEF1	Hs.555947	NM_001166119, NM_001130713, NM_001130714, NM_016269	9,82E-02
	RNASET2	Hs.720966, Hs.529989	NM_003730	9,89E-02
Таблица 1				
В: Сравнение полностью отвечающих (CR) и частично отвечающих (PR) индивидуумов				
	Таблица 1В			
	Ген	Unigene	Номер доступа	FDR
15	uc021oxm			0,000511026
	uc021охр			0,000511026
	SPTB	Hs.417303	NM_000347, NM_001024858	0,019052239
	ALS2CL	Hs.517937	NM_147129, NM_182775	0,025286191
20	TCF7	Hs.573153	NM_201633, NM_201632, NM_001134851, NM_001134852, NM_213648, NM_003202, NM_201634	0,025286191
	TRIL	Hs.21572	NM_014817	0,025286191
	WDR86	Hs.647083	NM_198285	0,025286191
	ACSM2B	Hs.567879, Hs.298252	NM_182617, NM_001105069	0,044953527
	DUSP4	Hs.417962	NM_001394, NM_057158	0,044953527
	EFHC1	Hs.403171	NM_018100	0,044953527
25	HS6ST2	Hs.385956	NM_147175, NM_001077188	0,044953527
	TRIB2	Hs.627749, Hs.467751	NM_021643	0,047492472
	SQLE	Hs.71465	NM_003129	0,053797924
30	PRR5-ARHGAP8	Hs.720401, Hs.102336	NM_001017530, NM_181333, NM_181334, NM_181335, NM_015366, NM_001017526, NM_001017529, NM_001017528	0,053797924
	C16orf74	Hs.461655	NM_206967	0,056452084
	TMIE	Hs.185777	NM_147196	0,056452084
	LO100131176	Hs.659231		0,056452084
	VSIG1	Hs.177164	NM_001170553, NM_182607	0,056452084
	MIR3194			0,056452084
	RAP1GAP2	Hs.499659	NM_015085, NM_001100398	0,057016164
35	FLJ13197	Hs.29725		0,084544923
	TSPEAR			0,084544923
	uc021zdn			0,084544923
	RASA3	Hs.593075	NM_007368	0,084544923
	OLIG3	Hs.195398	NM_175747	0,084544923
	GPR155	Hs.516604	NM_001033045, NM_152529	0,084544923
40	uc021ygq			0,084544923
	FAM19A1	Hs.655061	NM_213609	0,084544923
	LY9	Hs.403857	NM_002348, NM_001033667	0,084544923
	ANKRD20A5P			0,084544923
	C21orf15	Hs.580910		0,08962672
	ADHFE1	Hs.720023	NM_144650	0,08962672
45	MIR1293			0,098706653
	LOC730091	Hs.659905		0,098706653

**Пример 2: Идентификация новых транскрипционных генных сигнатур, которые прогнозируют ответ индивидуума на терапию клетками, экспрессирующими CAR против**

**CD19, при хроническом лимфоидном лейкозе (CLL) и остром лимфобластном лейкозе (ALL) с использованием анализа набора генов и дифференциального анализа экспрессии**

В настоящем примере описана идентификация новых транскрипционных генных сигнатур, которые прогнозируют ответ пациента на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, CTL019) при CLL и ALL, для применения в соответствии с настоящим изобретением.

В частности, в настоящем примере описаны способы анализа набора генов для обнаружения новых генных сигнатур для применения в соответствии с настоящим изобретением.

Среди прочего, в настоящем примере описаны новые генные сигнатуры на основе анализа набора генов, которые прогнозируют ответ пациента на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, CTL019). Анализ набора генов проводили на наборах генов, описанных в примере 1, и на наборах генов из трех дополнительных наборов данных. На фиг.2А представлена иллюстративная гистограмма, сравнивающая количество образцов, проанализированных в полногеномном анализе RNAseq для CTL019.  $p$ =продукт;  $a$ =аферез. Источниками наборов генов были (1) дополнительные эксперименты, которые были основаны на наборах генов Szabo *et al.* (описанных в настоящем описании); (2) наборы генов, опубликованные Abbas *et al.* в Genome Research 2005; и (3) наборы генов, опубликованные Gattinoni *et al.* в Nature Medicine 2011. Каждый из этих наборов генов более подробно описан ниже.

Наборы генов Szabo *et al.*, которые использовали в анализе набора генов, представлены в таблице 2. CD4+ Т-клетки человека очищали из PBMC (5 здоровых доноров, мужчины, возраст 18-28 лет, без известной аллергии или инфекций). CD4+ CD25+ (T<sub>REG</sub>) и CD4+ CD25- (Т-эффекторные) Т-клетки выделяли и стимулировали антителом против CD3/CD28 в течение 0 или 16 часов в 4 условиях: (1) T<sub>REG</sub>, 0 часов; (2) T<sub>REG</sub>, 16 часов; (3) Т-эффекторы, 0 часов; и (4) Т-эффекторы, 16 часов. Для каждого условия было получено два набора генов: один набор генов, уровни экспрессии которых повышались в этих условиях относительно всех других, и другой наборов, уровни экспрессии которых снижались в этих условиях относительно всех других. Количество генов в каждом наборе генов определялось пороговым значением кратности изменений (см. таблицу 2).

Таблица 2: Наборы генов, состоящие из генов, активированных или подавленных в T<sub>REG</sub> и T<sub>EFF</sub> в покое и при активации (набор данных Szabo)

Набор генов	Количество генов
Подавление T <sub>REG</sub> против T <sub>EFF</sub> , 0 ч (FC3 $p < 0,05$ )	120
Подавление T <sub>REG</sub> против T <sub>EFF</sub> , 16 ч (FC3 $p < 0,05$ )	139
Подавление T <sub>EFF</sub> , 16ч против 0 ч (FC7 $p < 0,05$ )	246
Активация T <sub>REG</sub> против T <sub>EFF</sub> , 16 ч (FC4 $p < 0,05$ )	254
Активация T <sub>REG</sub> против T <sub>EFF</sub> , 0 ч (FC4 $p < 0,05$ )	135
Активация T <sub>EFF</sub> , 16 ч против 0 ч (FC9 $p < 0,05$ )	347
Активация T <sub>REG</sub> , 16 ч против 0 ч (FC8 $p < 0,05$ )	226

Иллюстративные гены согласно таблице 2, которые были подавлены в T<sub>REG</sub> по сравнению с T<sub>EFF</sub> в момент времени 0 ч, включают ABCB1, ACSL6, ADAMTS10, ADD2, AIF1, AIF1, AIF1, AIF1, AK5, AKR1E2, ALS2CL, ANK3, ANKRD55, APBA2, AREG, ATHL1,

AXIN2, B4GALNT4, BACH2, BCL7A, BEND5, BHLHE40, BPGM, C10orf47, C16orf54, Clorf228, C2orf89, CA6, CACHD1, CACNA1I, CCL5, CELA1, CHD7, CHI3L2, COL18A1, COL6A1, CR2, CYB561, CYSLTR1, D4S234E, DACT1, DENND5A, DHRS3, DLG4, DLL1, DPYSL4, DSC1, EDAR, EMR1, EMR4P, ENC1, EPHA1, FCGBP, FHIT, GADD45G, GIPC3, 5 GIPC3, GPR125, GPR160, H1F0, HDGFRP3, HIPK2, IFITM5, KCNQ1, KLF5, KLHL29, KRT72, KRT73, LASS6, LRRC24, MAN1C1, ME3, MMP28, MTUS1, NBL1, NELL2, NEO1, NKG7, NLRP6, NME4, NOG, NOSIP, NPAS2, NRCAM, OBSCN, OSBPL5, PCSK5, PDZD4, PECAM1, PLLP, PLXDC1, PPFIBP2, PRKAR1B, PTK2, RHOB, RMRP, RNF157, SATB1, SCML4, SDK2, SEC14L2, SEC14L2, SLC15A3, SLC22A17, SLC22A23, SLC40A1, SNTB1, SORBS3, SOX8, 10 ST6GALNAC1, TCF7, TCF7, THEMIS, TMIGD2, VIPR1, WNT10B, WNT7A, ZNF467, ZNF516 и ZNF609.

Иллюстративные гены согласно таблице 2, которые были подавлены в  $T_{REG}$  по сравнению с  $T_{EFF}$  в момент времени 16 ч, включают IL2, TNFSF8, NELL2, G0S2, IRF8, IFNG, IGFBP4, GPR125, CD200, GPR81, ADD2, IL21, SNORD86, TMCC2, Clorf228, SLC15A3, 15 IL22, LRRN3, GPR171, FASLG, GZMH, NHS, MC0LN2, BACH2, TAGAP, MPZL2, PRAGMIN, DACT1, CXCL10, SLAMF6, PHGDH, CSF2, PRSS23, UHRF1, PLAC8, ISM1, BTLA, CDC20, GFOD1, HSD11B1, ME3, ZNF704, DHRS3, CXCL13, CCND1, NBL1, CRTAM, MAP6D1, H1F0, CDT1, CCL4, LIF, CD84, TRAT1, MIR155, SLAMF7, AIF1, AIF1, AIF1, AIF1, PRG4, VWCE, CHEK1, SH2D4A, MCM10, RHOA, NPAS2, NFIX, STAP1, DTL, C16orf59, CSDA, 20 GINS2, FAM117B, ABCB1, CLC, PHEX, GDF10, RAB13, BCL7A, MAMLD1, SHF, LPIN2, AHI1, CCND3, HDGFRP3, MIR155HG, PVR, CDCA5, RRAS2, SIPA1L2, RASL10B, GAL, SNORD88C, SNORD18B, CDC6, SRD5A3, ORC6L, B3GNT5, ANK3, MCM2, MIR25, RHOBTB3, TNF, TERT, CSDAP1, CCDC64, CDC25A, ZNF367, MCM7, CASP10, LTA, MCM4, AFF3, FMNL2, TNFRSF21, AXIN2, CHD7, FABP5, XRCC2, CGREF1, CCL4L1, 25 CCL4L2, B4GALNT4, DSCC1, CD97, PTPRK, RAD54L, EPB41L3, MYO1B, ORC1L, CHML, ZWINT, MAD2L1, NDST1, C11orf82, BEGAIN, CD55 и FABP5L3.

Иллюстративные гены согласно таблице 2, которые были подавлены в  $T_{EFF}$  в момент времени 16 ч против 0 ч, включают ABCA7, ABCG1, ABTB1, ACCS, ADAMTS10, ADD3, 30 AK5, ALS2CL, AMT, ANKRD55, ANXA1, AQP3, AREG, ARL4C, ARDC2, ARDC3, BBC3, BCL9L, BIN2, BNIP3L, BTG1, BTN3A1, C10orf110, C11orf21, C11orf35, C14orf181, C16orf54, C16orf74, C17orf108, C1orf162, C1QTNF6, C20orf111, C20orf112, C5orf39, C5orf41, C5orf41, CACNA1I, CAPS, CBX4, CCNL1, CDC14A, CDC42BPG, CECR1, CFP, CHI3L2, CITED4, CLK1, CRIP2, CSGALNACT1, CTSF, CTSW, CXCR4, CYTH4, DCHS1, DDIT3, DDX60L, 35 DISC1, DISC1, DISC1, DISC1, DPEP2, DPYD, DUSP1, DUSP8, EDAR, EMR4P, EPHA4, EPHX1, EPHX2, ERMN, ERP27, EVI2B, FAM13A, FAM13AOS, FAM46C, FAM65B, FBX032, FHIT, FLT3LG, FOS, FOSB, FRAT1, FYB, GABARAPL1, GABARAPL3, GADD45B, GOLGA7B, GPA33, GPRASP1, GRASP, GSTM2, GZMA, GZMK, HBP1, HERPUD2, HIST1H1C, HIST1H3A, HPCAL4, HSD17B11, ID1, IDUA, IER2, IFI44, IL10RA, IL11RA, 40 IRF2BP2, IRS2, ITGA6, JMY, JUN, JUNB, JUND, KCNQ1, KIAA1370, KIAA1683, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF6, KLHL24, KLHL3, KLRB1, KRT72, KRT73, LIME1, LOC100128071, LOC100289511, LOC282997, LOC283070, LOC338799, LOC728392, LTBP3, MAL, MAP2K6, MDS2, MEGF6, MEGF6, MFG8, MIR1909, MMP28, MOAP1, MXD4, MYADM, MYLIP, MYO15B, NFKBIZ, NLRC3, NLRP1, NOG, NR1D2, NR1D2, NR3C2, P2RY8, PBXIP1, PCSK5, 45 PDE4D, PDZD4, PER1, PGAM2, PGCP, PHF1, PHF1, PIK3IP1, PIK3R5, PIM1, PION, PLCD1, PLCH2, PLCL1, PLEKHB1, PLK2, PLXDC1, PNRC1, PPP1R15A, ProSAP1P1, RAB37, RAP1GAP2, RARRES3, RASA3, RASGRP2, REM2, RGS1, RGS2, RNF125, SAMD3, SCML4, SEC31B, SIGIRR, SIK1, SLC2A3, SLC2A4RG, SLC2A4RG, SLC9A9, SLFN5, SMAD7, SMPD1,

SNORA11, SORL1, SOX4, SULT1B1, SYNE1, SYTL1, TCEA3, TCF7, TCF7, TCP11L2, THEMIS, TMC8, TMEM63A, TMEM71, TMIGD2, TNFAIP3, TNNT3, TP53INP2, TPM2, TRANK1, TRIB2, TSC22D3, TSPAN18, TSPAN18, TSPAN32, TSSK3, TXK, TXNIP, UNC84B, UTRN, VIPR1, VSIG1, VSIG1, WHAMM, WNT10B, WNT7A, XAF1, XYLT1, XYLT1, YPEL2, YPEL3, YPEL5, ZBP1, ZBTB10, ZFP36, ZFP36L2, ZMAT1, ZNF331 и ZNF815.

Иллюстративные гены согласно таблице 2, активированные в  $T_{REG}$  против  $T_{EFF}$  в момент времени 16 ч, FC, включают ZBTB32, LRRC32, STAMBPL1, SNX10, LOC389333, ZNF193, GCNT1, FAS, GK3P, NTRK1, FREQ, IL1R1, CRADD, GNA15, RAB33A, IL18R1, CX3CR1, TNFRSF1B, APOBEC3G, FOXP3, SEPT11, CD70, IL1RL1, NIPA1, PANX2, CHST2, NEDD9, ACOT9, PDGFA, MAST4, TNFRSF8, PHLPP1, IL2RB, CTLA4, SYTL3, ZC3H12C, PTPRJ, UBASH3B, METRNL, PRDM1, SEPT3, TNFRSF18, WNT10A, CCR8, C18orf1, CSF1, CD80, GALNT4, GALNT4, IL1RL2, ADPRH, ZNF282, APOBEC3C, HS3ST3B1, EPAS1, RBKS, KAT2B, C9orf167, TYMP, IL1RAP, C2CD4A, CD68, ABHD4, MICAL2, C6orf145, DUSP16, LRIG1, CASK, EPSTI1, TNFRSF12A, IGSF3, SPATS2L, SPATS2L, MAF, CD58, KLHDC7B, ZBTB38, LAYN, IL1R2, HIP1, ITGB8, ITGB8, IKZF2, LGMN, XIRP1, GPR19, SAMD9L, PRF1, JAKMIP1, MGC29506, ADAM8, HLF, COL9A2, NDRG1, SAMHD1, AKAP5, RNF213, RNF213, APAF1, STX1A, SSH1, SSH1, CCRL2, CCR6, CSF2RB, HAVCR2, KLF5, MX1, ACTA2, OAS3, EMP1, CTNNAL1, MGC12916, CCL17, FOSL2, SAT1, TRPV2, PRIC285, SOCS2, ETV7, TIGIT, RASAL1, OPTN, MGST2, GPR68, MY01G, PTPLA, TNFRSF11A, ANXA2, IRF5, C14orf139, CAPN2, LFNG, IL12RB1, MY01E, GLRX, DENND3, ANXA2P2, NQO1, C10orf128, ANTXR2, ANTXR2, SLC26A11, FLVCR2, PREX1, SLC2A8, CDKN2A, TMEM149, SYT11, TOX, TOX2, FUT7, ANXA2P1, FAM129B, DFN31, TMPRSS6, IL1RN, ISG15, CDKN1B, FAM129A, TST, HDAC9, TMEM110, SMPD1, CDKN1A, C17orf67, ANXA2P3, MPST, IRF7, LMCD1, SNX24, HMOX1, ATP2B4, FCER2, HPGD, RASGRP4, FAM164A, IFI6, FAM110C, XKRX, PBX4, NTNG2, CST7, BASP1, C14orf49, GLIPR1, DHRS2, TWIST1, SPSB1, CYTH4, CADM1, ГГ1H4, LOC541471, CGA, LOC645166, PARP12, NINJ2, MICAL1, OAS1, HLA-DRB4, LGALS3, OASL, C0R02A, HLA-DRB3, KIAA1370, HERC6, STAC, MSC, CCR5, SUOX, RHOC, HLA-DQB2, PDE4A, LOC100302650, XAF1, FCRF3, RTKN2, GFIPR2, HLA-DRB1, IF13, P2RY10, IF10, CXCR6, FSP1, ACP5, SFC1A4, FXDYD7, TRIB2, FMNA, HLA-DPA1, MEOX1, FGAFS1, HLA-DRB5, IF10RA, HLA-DRA, CARD 16, IF5, RGS1, HLA-DQA2, AKR1C3, IF4, HLA-DMA, GPR55, AQP3, MUSTN1, P2RY8, FANK1, IF9, CCNG2, ADAM12, FOC654342, IF17A, PPP2R2B и FAM46C.

Иллюстративные гены согласно таблице 2, активированные в  $T_{REG}$  против  $T_{EFF}$  в момент времени 0 ч, FC4, включают C12orf75, SEFPFG, SWAP70, RGS1, PRR11, SPATS2F, SPATS2F, TSHR, C14orf145, CASP8, SYT11, ACTN4, ANXA5, GFRX, HLA-DMB, PMCH, RAB11FIP1, IF32, FAM160B1, SHMT2, FRMD4B, CCR3, TNFRSF13B, NTNG2, CFDND1, BARD1, FCER1G, TYMS, ATP1B1, GJB6, FGF2, TK1, SFC2A8, CDKN2A, SKAP2, GPR55, CDCA7, S100A4, GDPD5, PMAIP1, ACOT9, CEP55, SGMS1, ADPRH, AKAP2, HDAC9, IKZF4, CARD 17, VAV3, OBFC2A, ITGB1, CIITA, SETD7, HLA-DMA, CCR10, KIAA0101, SFC14A1, PTTG3P, DUSP10, FAM164A, PYHIN1, MY01F, SFC1A4, MYBF2, PTTG1, RRM2, TP53INP1, CCR5, ST8SIA6, TOX, BFSP2, ITPRIPF1, NCAPH, HLA-DPB2, SYT4, NINJ2, FAM46C, CCR4, GBP5, C15orf53, FMCD1, MKI67, NUSAP1, PDE4A, E2F2, CD58, ARHGEF12, FOC100188949, FAS, HLA-DPB1, SEEP, WEE1, HLA-DPA1, FCRF1, ICA1, CNTNAP1, OAS1, METTF7A, CCR6, HLA-DRB4, ANXA2P3, STAM, HLA-DQB2, FGAFS1, ANXA2, PI16, DUSP4, FAYN, ANXA2P2, PTPFA, ANXA2P1, ZNF365, FAIR2, FOC541471, RASGRP4, BCAS1, UTS2, MIAT, PRDM1, SEMA3G, FAM129A, HPGD, NCF4, FGAFS3, CEACAM4, JAKMIP1, TIGIT, HLA-DRA, IKZF2, HLA-DRB1, FANK1, RTKN2, TRIB1, FCRF3 и FOXP3.

Иллюстративные гены согласно таблице 2, активированные в  $T_{EFF}$  в момент времени 16 ч против 0 ч, включают AARS, ABCF2, ACOT7, ACTF6A, AHSA1, AIM2, AIMP2, AFAS1, AFDH1B1, ANKRD13B, APOF1, ARMCX3, ASPHD2, B3GNT5, B4GAFT2, B4GAFT5, BATF, BATF3, BCAT2, BCF2F1, BOP1, BTFA, BYSF, C11orf75, C15orf23, C15orf63, C16orf59, C17orf79, C17orf96, Clorf163, C3orf26, C4orf43, C8orf30A, C9orf64, CAD, CBR1, CCDC56, CCDC86, CCF20, CCL3, CCL3F1, CCL3F3, CCL4, CCL4F1, CCL4F2, CCNB1, CCND2, CCT3, CCT5, CCT6A, CCT7, CD109, CD200, CD274, CD3EAP, CD40LG, CD82, CDC20, CDC45F, CDC6, CDK4, CDT1, CENPM, CETN3, CHAC2, CHEK1, CISD1, CISH, CKS1B, COPB2, CORO1C, CSF2, CTNNA1, CTPS, CTTN, DARS2, DCAF12, DCTPP1, DHCR24, DKC1, DTE, E2F1, EBNA1BP2, ECE2, EDARADD, EEF1E1, EGR2, EIF2B3, EIF2S1, EIF5B, EIF6, ENO1, ESPL1, EXOSC3, EXOSC4, F5, F5, FABP5, FABP5F3, FADS1, FAM40B, FARSA, FASFG, FDPS, FKBP4, FKBP4, FOSF1, FREQ, G0S2, G3BP1, GAFE, GAR1, GART, GEM, GEMIN6, GEMIN7, GFOD1, GINS1, GINS2, GFRX2, GNG8, GNPDA1, GPATCH4, GPN3, GPR171, GTF2H2D, HIVEP3, HMGCS1, HN1F, HNRNPAB, HSPD1, HSPE1, HYAF2, IARS, IER3, IFNG, IFRD2, IGFBP4, IF12RB2, IF15RA, IF17F, IF2, IF21, IF22, IL2RA, IF3, IRF4, IRF8, ISOC2, KCNK5, KEAP1, KIAA0020, KIAA0664, LAG3, FAPTM4B, FARP4, FIF, FOC286016, FOC344967, FOC442308, FOC728402, FRP8, FSM2, ETA, FYAR, MANF, MATK, MCM10, MCM2, MCM3, MCM4, METTF13, MIR1182, MIR155, MIR155HG, MIR621, MPV17F2, MPZF2, MRM1, MRPF12, MRPF15, MRPF17, MRPF35, MRPF51, MRPS17, MRPS23, MRT04, MTCH2, MTHFD1F, MTHFD2, MYOF, NAB2, NDFIP2, NDUFAF1, NFE2F3, NFKBIF2, NFN, NME1, NME1-NME2, NOFC1, NOP16, NPTX1, NT5DC2, NUDCD1, NUP43, NUP62, OTUD7B, PACSIN3, PAICS, PAK1IP1, PAM, PDCD1, PDCD2F, PDIA4, PDIA6, PEA15, PFAS, PFDN6, PFDN6, PFKM, PFKP, PGAM1, PGAM4, PHB, PHF6, PKM2, PFAGF2, PNPO, POFD2, POFE2, POFR3K, POP1, PPIF1, PPP1R14B, PRDX1, PRDX3, PRDX4, PRMT1, PRMT5, PRSS23, PSAT1, PSMA3, PSMA5, PSMA6, PSMB3, PSMB5, PSMD1, PSMD11, PSMD14, PTGFRN, PTMS, PTRH1, PTRH2, PUS7, PYCR1, PYCRF, RARS, RBBP8, RCC1, RPF2, RPP25, RRP1, RRP9, RUVBF1, RUVBF2, SAMD4A, SCD, SDC4, SECTM1, SEH1F, SEMA7A, SFT2D1, SFXN1, SH2D2A, SHF, SHMT2, SIPA1F2, SLAMF1, SFC1A5, SFC27A2, SFC27A4, SFC29A1, SFC38A5, SFC39A14, SFC43A3, SFC6A9, SFC04A1, SNORA18, SNORD17, SORD, SPR, SQFE, SRM, SRXN1, STIP1, STT3A, TAFD01, TAPI, TBKBP1, TBF3, TBX21, TIMM8B, TIMM8B, TIPIN, TMCC2, TMEM165, TMEM194A, TMEM208, TMEM97, TNF, TNFAIP8F2, TNFRSF4, TNFRSF9, TNFSF14, TOMM40, TPII, TRIP10, TRIP13, TTFF12, TUBA1B, TUBB, TUBB, TUBB, TUBG1, TXN, TXNDC5, UBE2T, UCK2, UGDH, UHRF1, UMPS, UTP6, VDAC1, VDR, WARS, WDR12, WDR18, WDR3, WDR4, WDR77, YIF1A, YWHAG, ZBED2, ZDHHC16, ZNF593, ZNF607 и ZWINT.

Иллюстративные гены согласно таблице 2, активированные в  $T_{REG}$  в момент времени 16 ч против 0 ч, Fc8, включают AARS, ACOT7, AGRN, AHSA1, AIM2, AIMP2, AFAS1, AFDH1B1, APOF1, APOF2, B4GAFT2, BATF, BATF3, BCF2A1, BCF2F1, BOP1, BYSF, C17orf96, C2CD4A, C5orf32, C9orf64, CCDC86, CCL17, CCF20, CCT5, CD3EAP, CD40LG, CD68, CD7, CDK2AP2, CDK4, CHAC2, CHPF, CISD1, CISH, COPB2, CRIM1, CSF1, CTFA4, CTSL1, CTTN, DCTPP1, DHCR24, EB13, EBNA1BP2, ECE2, EDARADD, EGR2, EMP1, ENO1, EPAS1, EXOSC4, FABP5, FAH, FAM40B, FARSA, FKBP4, FKBP4, FLT1, FLT1, FOSL1, FREQ, G6PD, GALE, GART, GCLM, GEM, GK, GNPDA1, GPR56, HIVEP3, HMGCS1, HMOX1, HN1L, HSPA1A, HSPA1B, HSPD1, HSPE1, HYAL2, IER3, IFRD2, IKBIP, IL10, IL12RB2, IL13, IL15RA, IL17A, IL1R1, IL1R2, IL1RL2, IL1RN, IL2RA, IL3, IL4, IL4I1, IL5, IL9, IRF4, KCNK5, LAG3, LAPTM4B, LIF, LOC344967, LOC389333, LOC442308, LRRC32, LRRC61, LTA, LYAR, MANF, MATK, METRNL, METTL13, MGC29506, MICAL2, MIR1182, MIR155, MIR155HG, MLEC, MRPL12, MRT04, MTHFD1L, MYOF, NAB2, NDFIP2,

NDUFAF1, NKG7, NLN, NME1, NME1-NME2, NOP16, NPM3, NUDCD1, PAICS, PANX2, PDCD1, PDGFA, PDIA4, PDIA6, PFAS, PGAM4, PHB, PNPO, POP1, PPIL1, PPPDE2, PRDX1, PRDX3, PRDX4, PRKAR1B, PRMT1, PRMT5, PSAT1, PSMB5, PSMD1, PSMD11, PTGFRN, PTRH1, PUS7, PYCR1, RASAL1, RBBP8, RCC1, SC4MOL, SCD, SDC4, SECTM1, SEH1L, SEMA7A, SETP11, SERPINE2, SERPINH1, SH2D2A, SLC16A13, SLC16A3, SLC1A5, SLC27A2, SLC27A4, SLC29A1, SLC38A5, SLC39A1, SLC39A14, SLC43A3, SLC04A1, SOCS1, SPHK1, SPINT1, SQLE, SRM, SRXN1, STIP1, STT3A, TBKBP1, TBX21, TMPRSS6, TNF, TNFRSF11A, TNFRSF12A, TNFRSF18, TNFRSF1B, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFSF14, TOMM40, TRIP10, TTLL12, TUBB, TUBB, TUBB, TXN, TYMP, UCK2, UGDH, VDR, VTRNA1-3, WARS, WDR12, WDR4, WDR77, XIRP1, YWHAG, ZBED2, ZBTB32, ZDHHC16 и ZNF282.

Иллюстративный перечень генов T<sub>REG</sub>, активированных через 16 ч, включает AIM2, ALAS1, BATF, C5orf32, CCL17, CD40LG, CHAC2, CSF1, CTSL1, EBNA1BP2, EDARADD, EMP1, EPAS1, FABP5, FAM40B, FKBP4, FOSL1, GCLM, GK, GPR56, HMOX1, HSPD1, HSPE1, IKBP1, IL10, IL13, IL15RA, IL1RN, IL2RA, IL3, IL4, IL5, IL9, KCNK5, LTA, MANF, MIR1182, MIR155, MIR155HG, MYOF, NDUFAF1, NLN, NME1, NME1-NME2, PANX2, PDIA6, PGAM4, PPIL1, PPPDE2, PRDX4, PRKAR1B, PSMD1, PSMD11, PUS7, RBBP8, SLC27A2, SLC39A14, SLC43A3, SRXN1, STIP1, STT3A, TBX21, TNFRSF11A, TNFRSF1B, TNFRSF8, TNFRSF9, TXN, UCK2, VDR, VTRNA1-3, WDR12, YWHAG, ZDHHC16 и ZNF282. Повышенную экспрессию можно определять, например, посредством измерения уровней РНК указанных генов.

Иллюстративный перечень генов T<sub>EFF</sub>, активированных в момент времени 16 ч, включает AIM2, ALAS1, B4GALT5, BATF, C3orf26, C4orf43, CCL3, CCL4, CCT3, CCT7, CD40LG, CHAC2, CSF2, CTNNA1, EBNA1BP2, EDARADD, EEF1E1, EIF2B3, EIF2S1, FABP5, FAM40B, FKBP4, FOSL1, GFOD1, GLRX2, HSPD1, HSPE1, IFNG, IL15RA, IL21, IL2RA, IL3, KCNK5, KIAA0020, LARP4, LRP8, LTA, MANF, MIR1182, MIR155, MIR155HG, MTCH2, MYOF, NDUFAF1, NLN, NME1, NME1-NME2, OTUD7B, PAM, PDIA6, PEA15, PFKM, PGAM1, PGAM4, PPIL1, PRDX4, PRSS23, PSMD1, PSMD11, PSMD14, PTRH2, PUS7, RBBP8, RPF2, RPP25, SFXN1, SLC27A2, SLC39A14, SLC43A3, SORD, SPR, SRXN1, STIP1, STT3A, TBX21, TMCC2, TMEM165, TNFRSF9, TXN, TXNDC5, UCK2, VDR, WDR12, YWHAG и ZDHHC16.

Посредством наборов генов Abbas сравнивали профили экспрессии 17 типов иммунных клеток, и были идентифицированы гены, уникально экспрессируемые в определенных типах клеток относительно других. Отдельные наборы генов Abbas, которые были включены в анализ набора генов, приведены в таблице 3 и включают наивные и покоящиеся CD4+ Т-клетки, наивные и покоящиеся CD8+ Т-клетки, хелперные Th1 через 12 часов, хелперные Th1 через 48 часов, хелперные Th2 через 12 часов, хелперные Th2 через 48 часов, покоящиеся (наивные) Т-клетки памяти и активированные Т-клетки памяти.

Таблица 3: Наборы генов, состоящие из покоящихся и активированных подтипов Т-клеток с активированными или подавленными генами (набор данных Abbas)

Таблица 3	
Набор генов	Количество генов
Подавленные CD8 против CD4 наивных Т-клеток	200
Подавленные наивные CD4 против активированных Th1 через 12 ч	200
Подавленные наивные CD4 против активированных Th1 через 48 ч	200
Подавленные наивные CD4 против активированных Th2 через 12 ч	200
Подавленные наивные CD4 против активированных Th2 через 48 ч	200

	Подавленные Th1 против активированных Th2 через 12 ч	200
	Подавленные Th1 против активированных Th2 через 48 ч	200
	Подавленные нестимулированные против стимулированных Т-клеток памяти	200
	ЕТр-регулируемые CD8 против CD4 наивных Т-клеток	200
5	ЕТр-регулируемые наивные CD4 против активированных Th1 через 12 ч	200
	ЕТр-регулируемые наивные CD4 против активированных Th1 через 48 ч	200
	Активированные наивные CD4 против активированных Th2 через 12 ч	200
	Активированные наивные CD4 против активированных Th2 через 48 ч	200
	Активированные Th1 против активированных Th2 через 12 ч	200
	Активированные Th1 против активированных Th2 через 48 ч	200
10	Активированные нестимулированные против стимулированных Т-клеток памяти	200

Посредством наборов генов Gattinoni сравнивали профили экспрессии различных подгрупп CD8+ Т-клеток памяти. В частности, иммунные клетки выделяли от здоровых доноров и очищали следующие подгруппы CD8+ Т-клеток памяти: T<sub>N</sub> (наивные), T<sub>SCM</sub> (стволовые клетки памяти), T<sub>CM</sub> (центральные клетки памяти), T<sub>EM</sub> (эффекторные клетки памяти). Подгруппы генов определяли путем сравнения всех пар групп (например, T<sub>SCM</sub> против T<sub>N</sub>) и путем идентификации генов, которые либо прогрессивно активировались, либо прогрессивно ингибировались, в 4 условиях в порядке T<sub>N</sub>→T<sub>SCM</sub>→T<sub>CM</sub>→T<sub>EM</sub>. Выбранные наборы генов Gattinoni *et al.*, которые рассматривались в анализе наборов генов, приведены в таблице 4.

Таблица 4: Наборы генов, состоящие из покоящихся и активированных подтипов Т-клеток с активированными или подавленными генами (набор данных Gattinoni)

Набор генов	Количество генов
T <sub>CM</sub> против T <sub>EM</sub>	29
T <sub>N</sub> против T <sub>CM</sub>	148
T <sub>N</sub> против T <sub>EM</sub>	212
T <sub>SCM</sub> против T <sub>CM</sub>	19
T <sub>SCM</sub> против T <sub>EM</sub>	75
T <sub>SCM</sub> против T <sub>N</sub>	73
Прогрессирующее подавление	208
Прогрессирующая активация	32

Каждый набор генов (например, наборы генов RNAseq ALL и CLL, наборы генов Szabo, наборы генов Abbas и наборы генов Gattinoni) оценивали для определения их ассоциации с ответом индивидуума (т.е. CR, PR или NR) следующим образом: для каждого индивидуума вычисляли метаген, где показатель метагена для индивидуума  $j$  определяли как

$$m_j = \sum_{i=1}^G x_{ij} - \mu(x_{.j}) / \sigma(x_{.j})$$

где  $x_{ij}$  представляет собой величину экспрессии гена  $i$  у индивидуума  $j$  для данного набора генов  $n=1, \dots, G$ ;  $\mu(x_{.j})$  представляет собой среднее значение для генов  $1, \dots, G$  индивидуума  $j$ ; и  $\sigma(x_{.j})$  представляет собой стандартное отклонение для генов  $1, \dots, G$  индивидуума  $j$ .

Для каждого набора генов использовали статистическую модель из 3-групп для определения того, отличался ли метаген статистически между продуктами CR, PR и NR при CLL. Схематическая иллюстрация этого подхода приведена на фиг.2B. CR в большей



мере имели покоящиеся клетки  $T_{EFF}$ , в то время как NR в большей мере имели активированные клетки  $T_{EFF}$ . Образцы CTL019 NR имеют более активированное состояние, чем образцы CR. Наборы генов, для которых было обнаружено, что они являются значимо измененными и прогнозирующими ответ пациента на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, T-клетками, NK-клетками) (например, CTL019), приведены в таблице 5.

Таблица 5: Наборы генов, перепредставленные в образцах при CLL

Таблица 5					
Набор генов	Источник	CR	NR	Продукт	Аферез
$T_{EFF}$ , 16 ч против 0 ч	Szabo	$T_{EFF}$ , 0 ч	$T_{EFF}$ , 16 ч	X	X
$T_{REG}$ 16 ч против 0 ч	Szabo	$T_{REG}$ , 0 ч	$T_{REG}$ , 16 ч	X	X
$T_{REG}$ против $T_{EFF}$ , 16 ч	Szabo	$T_{EFF}$	$T_{REG}$	X	X
Наивные CD4 против активированных Th1 через 12 ч	Abbas	Наивные CD4	Th1	X	X
Наивные CD4 против активированных Th2 через 12 ч	Abbas	Наивные CD4	Th2	X	X
Наивные CD4 против активированных Th1 через 48 ч	Abbas	Наивные CD4	Th1	X	X
Наивные CD4 против активированных Th2 через 48 ч	Abbas	Наивные CD4	Th2	X	X
Нестимулированные против стимулированных клеток памяти	Abbas	Нестимулированные	Стимулированные	X	
$T_{SCM}$ против $T_{EM}$	Gattinoni	$T_{SCM}$	$T_{EM}$	X	
$T_{SCM}$ против $T_{CM}$	Gattinoni	$T_{SCM}$	$T_{CM}$	X	
$T_{CM}$ против $T_{EM}$	Gattinoni	$T_{EM}$	$T_{CM}$	X	
Прогрессирующее подавление	Gattinoni	Ранняя стадия	Поздняя стадия	X	X

На фиг.3 представлена иллюстративная схема предшественников и подгрупп T-клеток памяти. Без связи с конкретной теорией, состояние T-клеток памяти в образцах CTL019, вероятно, является основным компонентом ответа.

Для подгруппы пациентов в исследовании произведенного продукта, описанном в примере 1, полногеномное RNAseq также проводили для T-клеток, полученных посредством афереза. Наборы генов, описанные выше, оценивали в этих 14 подвергнутых аферезу образцах (2 CR, 3 PR и 9 NR). Наборы генов, для которых было обнаружено, что они значительно изменены и прогнозируют ответ пациента на терапию CTL019, приведены в таблице 5.

Полногеномное исследование RNAseq проводили для 7 образцов произведенного продукта CR при ALL и 4 образцов CR при ALL, полученных посредством афереза. Показатели метагенов для каждого набора генов вычисляли для образцов ALL, как описано выше для образцов CLL. Наборы генов с показателями метагенов, коррелирующими с ожидаемым профилем ответа в образцах продукта и образцах, полученных посредством афереза (ALL→CLL CR→CLL PR→CLL NR), приведены в таблице 6. Наборы генов, обозначенные \* в таблице 6, также коррелировали с ответом в образцах, полученных посредством афереза.

Таблица 6: Наборы генов, коррелирующие с ответом в образцах продуктов ALL и CLL (ALL→CLL CR→CLL PR→CLL NR)

Таблица 6	
Набор генов	
	Подавленные $T_{REG}$ против $T_{EFF}$ , 0 ч FC3 $p < 0,05$ *
	Подавленные $T_{REG}$ против $T_{EFF}$ , 16 ч (FC3 $p < 0,05$ )

	Подавленные T <sub>REG</sub> против T <sub>EFF</sub> , 0 ч (FC4 p<0,05)*
	Подавленные T <sub>REG</sub> против T <sub>EFF</sub> , 16 ч (FC4 p<0,05)
	Набор подавленных генов T <sub>CM</sub> против T <sub>EM</sub>
	Набор активированных генов T <sub>CM</sub> против T <sub>EM</sub>
5	Набор подавленных генов T <sub>N</sub> против T <sub>CM</sub> *
	Набор активированных генов T <sub>N</sub> против T <sub>CM</sub> *
	Набор подавленных генов T <sub>N</sub> против T <sub>EM</sub> *
	Набор активированных генов T <sub>N</sub> против T <sub>EM</sub> *
	Набор подавленных генов T <sub>SCM</sub> против T <sub>CM</sub> *
	Набор активированных генов T <sub>SCM</sub> против T <sub>CM</sub> *
10	Набор активированных генов T <sub>SCM</sub> против T <sub>EM</sub> *
	Набор подавленных генов T <sub>SCM</sub> против T <sub>N</sub> *
	Набор активированных генов T <sub>SCM</sub> против T <sub>N</sub> *
	Прогрессирующее подавление*
	Прогрессирующая активация *
	Подавленные CD8 против CD4 наивных Т-клеток*
15	Активированные наивные CD4 против активированных Th1 через 12 ч
	Активированные наивные CD4 против активированных Th1 через 48 ч
	Активированные наивные CD4 против активированных Th2 через 12 ч
	Активированные наивными CD4 против активированных Th2 через 48 ч*
	Подавленные Th1 против Th2 активированных через 12 ч

Например, было обнаружено, что показатель метагенов для набора генов, состоявшего из генов, активированных в T<sub>SCM</sub> по сравнению с T<sub>CM</sub>, коррелировал с ответом как в образцах, полученных посредством афереза, так и в образцах продукта, фиг.4. Показатели метагенов для образцов здоровых доноров с произведенным продуктом включали в график в качестве точки сравнения. На оси x представлены образцы по группе ответа, где a=аферез и p=продукт. На оси y представлены нормализованные показатели экспрессии метагенов. Наборы генов, перепредставленные у CR при CLL (например, CR с STF019), также были перепредставлены при остром лимфобластном лейкозе (ALL). У CR при ALL и CLL перепредставлены в подгруппе генов, специфических для стволовых Т-клеток (T<sub>SCM</sub>), в то время как у PR и NR при CLL перепредставлены подгруппы генов центральных Т-клеток памяти (T<sub>CM</sub>). В образцах, полученных посредством афереза, наблюдают тот же профиль, что и в образцах продукта. Профили экспрессии ALL являются наиболее сходными с профилями у CR при CLL и являются еще более выраженными в направлении покоящихся/нестимулированных/ранних Т-клеток памяти.

На фиг.5А представлен иллюстративный результат анализа основных компонентов (PCA) для образцов STF019. Этот иллюстративный результат PCA показывает, что у CR ALL и нормальные образцы кластеризуются отдельно от PR и NR. На фиг.5B представлен иллюстративный результат PCA для образцов STF019 и образцов, полученных посредством афереза. Этот иллюстративный результат PCA показывает, что CR, ALL и нормальные образцы кластеризуются отдельно от PR и NR и от кластера образцов, полученных посредством афереза.

На фиг.6 представлена иллюстративная схема, изображающая иммунофенотипирование образцов, полученных посредством афереза, и образцов продукта. Произведенный продукт CTL019 (например, полученные способами генной инженерии CAR19-экспрессирующие Т-клетки, полученные от пациентов с CLL), классифицированный как продукт полностью отвечающих (CR) индивидуумов, частично отвечающих (PR) индивидуумов, не отвечающих (NR) индивидуумов, или неопределенный, оценивали в отношении экспрессии ингибиторных молекул иммунной

точки контроля, таких как PD-1, LAG3 и TIM3.

Клетки, экспрессирующие CAR против CD19 (например, Т-клетки, НК-клетки) от пациентов с CLL (например, произведенный продукт) с различными ответами на терапию CAR-экспрессирующими клетками анализировали проточной цитометрией для определения процентов CD4+ и CD8+ Т-клеток. Клетки, экспрессирующие CAR против CD19, были от: пациентов, которые отвечали на терапию CAR-экспрессирующими клетками (CR) (n=5); пациентов, которые частично отвечали на терапию CAR-экспрессирующими клетками (n=8), пациентов, которые не отвечали на терапию CAR-экспрессирующими клетками (NR) (n=19); и неопределенных пациентов, например, еще не отнесенных к группе (NA) (n=3). Клетки метили антителами, которые специфически распознают CD4, CD8, молекулу CAR19 и молекулы иммунной точки контроля PD-1, LAG3 и TIM3, и вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцеинами, в соответствии со стандартными способами проточно-цитометрического анализа, известными в данной области. Экспрессию каждого маркера, например, CD4+, CD8+ и т.д., определяли с помощью программного обеспечения для проточно-цитометрического анализа и субпопуляции (например, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или CAR19-экспрессирующие Т-клетки) далее анализировали в отношении экспрессии молекул иммунной точки контроля PD-1, LAG3 и TIM3.

С использованием способов и анализа, описанных выше, определяли процент CD4-экспрессирующих клеток и CD8-экспрессирующих клеток для каждого пациента в каждой группе ответа. Как описано выше, анализировали 36 произведенных образцов CTL019 от пациентов с CLL, и они включали 5 CR, 8 PR, 19 NR и 3 неопределенных. На фиг.7А представлен иллюстративный результат, показывающий процент CD4+ клеток и ответ пациентов. Было показано, что частично отвечающие индивидуумы имеют статистически значимо более высокий процент CD4+ клеток. На фиг.7В представлен иллюстративный результат, показывающий процент CD8+ клеток и ответ пациентов. Было показано, что полностью отвечающие индивидуумы имеют статистически значимо более высокий процент CD8+ клеток.

Пример проточно-цитометрического анализа профилей для определения поверхностных маркеров представлен на фиг.8А и 8В. Клетки, экспрессирующие CD4, определяли с использованием проточной цитометрии и далее анализировали в отношении экспрессии CAR19 и PD-1, так что ось x профилей указывает на экспрессию CAR19 (верхний левый (Q5) и нижний левый (Q8) квадранты демонстрируют CAR19-отрицательные CD4+ клетки, в то время как верхний правый (Q6) и нижний правый (Q7) квадранты демонстрируют CAR19-экспрессирующие CD4+ клетки) и ось y демонстрирует экспрессию PD-1 (нижние левый (Q8) и правый (Q7) квадранты демонстрируют отрицательные по PD-1 CD4+ клетки и верхние левый (Q5) и правый (Q6) квадранты демонстрируют экспрессирующие PD-1 CD4+ клетки). В популяции CD4+ от отвечающего на CAR-экспрессирующие клетки (например, Т-клетки, НК-клетки) пациента, 44,7% CD4+ клеток в целом экспрессировали PD-1, и приблизительно 22,3% CAR19-экспрессирующих клеток были положительными по PD-1, в то время как 27,2% CAR19-экспрессирующих клеток были отрицательными по PD-1 (фиг.8А). Напротив, в популяции CD4+ от не отвечающего пациента было значительное уменьшение CAR19-экспрессирующих клеток в целом (приблизительно 15,3% по сравнению с 49,5% у CR), причем 14,7% CAR19-экспрессирующих клеток были положительными по PD-1, в то время как только 0,64% были отрицательными по PD-1 (фиг.8В). Сравнение между профилями на фиг.8А и фиг.8В показывает, что значительно более высокий процент CD4+ клеток от не отвечающего пациента экспрессируют PD-1

(приблизительно 92,9%) по сравнению с отвечающим на CAR-экспрессирующие клетки пациентом (приблизительно 44,7%).

С использованием способов и анализа, описанных выше, определяли процент экспрессирующих PD-1 (PD-1+) клеток в CD4+ популяции и CD8+ популяции для каждого пациента в каждой группе ответа. Было показано, что не отвечающие пациенты имеют более высокий процент PD-1+ клеток как в популяции CD4+ (фиг.8C), так и в популяции CD8+ (фиг.8D) по сравнению с пациентами, которые отвечали на терапию CAR (CR); увеличение среднего процента PD-1 было статистически значимым как для CD4+ популяции, так и для CD8+ популяции.

Дальнейший анализ проводили для определения распределения клеток, экспрессирующих PD-1, LAG3 и TIM3, у пациентов с различным ответом на терапию CAR. Репрезентативный анализ клеток в отношении профиля экспрессии PD-1, LAG3 и TIM3 в популяции CD4+ представлен на фиг.9 и фиг.10. Популяции клеток сначала анализировали в отношении экспрессии CAR19+. Затем CAR19+ популяцию анализировали в отношении экспрессии PD-1 и LAG3 (фиг.9) или экспрессии PD-1 и TIM-3 (фиг.10). В LAG3+ популяции от индивидуума, отвечающего на CAR-экспрессирующие клетки (например, Т-клетки, НК-клетки), 36,1% CAR19+ клеток в целом экспрессировали PD-1, и приблизительно 7,3% LAG3-экспрессирующих клеток были положительными по PD-1, в то время как 5,9% LAG3-экспрессирующих клеток были отрицательными по PD-1 (фиг.9). Напротив, в популяции CAR19+ от не отвечающего индивидуума происходило значимое увеличение LAG3-экспрессирующих клеток в целом (приблизительно 69,7% по сравнению с 13,2% у CR), причем 67,3% LAG3-экспрессирующих клеток были положительными по CAR19+, в то время как только 2,41% были отрицательными по PD-1 (фиг.9). Сравнение между профилями проточной цитометрии у CR и N, представленными на фиг.9 показывает, что значительно более высокий процент LAG3+ клеток не отвечающего индивидуума экспрессирует PD-1 (приблизительно 67,3%) по сравнению с индивидуумом, отвечающим на CAR-экспрессирующие клетки (например, Т-клетки, НК-клетки) (приблизительно 7,3%).

С использованием способов и анализа, описанных выше, определяли процент клеток, экспрессирующих PD-1 и LAG-3 (PD-1+/LAG-3+), в популяции CAR19+ для каждого пациента в каждой группе ответа. Было показано, что не отвечающие пациенты имеют более высокий процент клеток PD-1+/LAG-3+ в CAR19+ популяциях по сравнению с пациентами, которые отвечали на терапию CAR (CR) (фиг.9); увеличение среднего процента PD-1/LAG-3 было статистически значимым для популяции CAR19+. Частично отвечающие индивидуумы (PR) демонстрировали более высокие проценты PD-1+/LAG-3+ клеток, чем отвечающие индивидуумы (CR), в CAR19+ популяции (фиг.9). В одном варианте осуществления продукты NR демонстрируют фенотип PD1+ CAR+ и коэкспрессию LAG3.

Далее, CAR19+ популяцию анализировали в отношении экспрессии PD-1 и TIM-3 (фиг.10). В популяции TIM+ от индивидуума, отвечающего на CAR-экспрессирующие клетки (например, Т-клетки, НК-клетки), 28,5% CAR19+ клеток в целом экспрессировали PD-1 (фиг.10). Напротив, в популяции CAR19+ от не отвечающего индивидуума происходило значимое увеличение количества TIM3+/PD1+ клеток, причем 83,3% CAR19+-экспрессирующих клеток были TIM3+/PD1+ (фиг.10).

С использованием способов и анализа, описанных выше, определяли процент клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3 (PD-1+/TIM-3+) в популяции CAR19+ для каждого пациента в каждой группе ответа. Было показано, что не отвечающие пациенты имеют более высокий процент клеток PD-1+/TIM-3+ в популяциях CAR19+ по сравнению с

пациентами, которые отвечали на терапию CAR (CR) (фиг.10); увеличение среднего процента PD-1/TIM-3 было статистически значимым для популяции CAR19+. Частично отвечающие индивидуумы (PR) демонстрировали более высокие проценты PD-1+/TIM-3+ клеток, чем отвечающие индивидуумы (CR), в CAR19+ популяции (фиг.10). В одном варианте осуществления продукты NR демонстрируют истощенный фенотип PD1+ CAR+ и коэкспрессию TIM3.

Клетки, экспрессирующие CD4+ и CD8+, определяли с использованием проточной цитометрии и далее анализировали в отношении экспрессии CD27+. С использованием способов и анализа, описанных выше, процент клеток, экспрессирующих CD27 (CD27+), в CD4+ популяции и CD8+ популяции определяли для каждого пациента в каждой группе ответа. Было показано, что полностью отвечающие (CR) и частично отвечающие (PR) индивидуумы имеют более высокий процент CD27+ клеток как в CD4+ популяции (фиг.11A), так и в CD8+ популяции (фиг.11B) по сравнению с не отвечающими индивидуумами (NR); увеличение среднего процента CD27 было статистически значимым как для CD4+ популяции, так и для CD8+ популяции. Частично отвечающие индивидуумы (PR) демонстрировали более высокий процент CD27+ клеток, чем полностью отвечающие индивидуумы (CR), в CD4+ популяциях (фиг.11A). В CD8+ популяциях полностью отвечающие (CR) индивидуумы демонстрировали более высокий процент CD27+ клеток, чем частично отвечающие индивидуумы (PR) (фиг.11B). В одном варианте осуществления уровни CD27 в продукте CAR коррелируют с ответом пациента. В одном варианте осуществления CD8+ клетки CR демонстрируют более высокий процент CD27+ клеток по сравнению с PR и NR.

На фиг.12 показан иллюстративный результат многоцветного проточно-цитометрического анализа, идентифицирующего корреляцию ответа в образцах, полученных посредством афереза. Анализировали 26 образцов от пациентов с CLL, полученных посредством афереза. Образцы включали 4 CR, 6 PR, 14 NR и 1 пациента, которому инфузию не проводили.

На фиг.13 представлен результат иллюстративного многоцветного проточно-цитометрического анализа, иллюстрирующий корреляцию между фенотипом более молодых Т-клеток и ответом на терапию CTL019. Эти данные демонстрируют, что процент CD27+ CD45RO- среди CD8+ Т-клеток прогнозирует, какие пациенты с CLL будут иметь полный ответ на CTL019.

На фиг.14 представлен иллюстративный анализ афереза у пациента-человека перед терапией CTL019. Иллюстративные результаты иллюстрируют, что, хотя пациент 1000-00045 имел очень мало Т-клеток, 27% Т-клеток были CD8+ CD27+ CD45RO-.

На фиг.15 представлен иллюстративный результат ответа пациента (пациент 1000-00045) на терапию CTL019. CD8+ CD27+ CD45RO- Т-клетки были положительным прогностическим фактором ответа пациента на терапию CTL019. Эти иллюстративные результаты показывают, что хороший прогностический фенотип при аферезе представляет собой высокий процент CD8+ CD27+ CD45RO- Т-клеток (наивных или фенотипа T<sub>SCM</sub>). Плохим прогностическим фенотипом в продукте CTL019 является высокий процент PD1+ CAR+ и LAG3+ или TIM3+ Т-клеток (истощенный фенотип).

Значимые наборы генов из анализов, приведенных выше, уточняли до подгруппы генов в наборах генов, которые на статистически значимом уровне дифференциально экспрессировались между ALL CR/CLL CR и CLL NR, а также в соответствии с ожидаемым профилем экспрессии, имеющим увеличение или снижение от ALL→CLL CR→CLL PR→CLL NR. Иллюстративный перечень генов, которые на значимом уровне дифференциально экспрессировались, приведен в таблице 7А. Таблица 7А представляет

собой иллюстративный перечень биомаркеров, величины экспрессии которых прогнозируют ответ пациента на терапию CTL019. Таблицу 7А далее уточняли для получения панели биомаркерных генов, определенных посредством проточной цитометрии, путем выбора генов, которые являются маркерами клеточной поверхности.

5 Иллюстративные гены клеточной поверхности, которые прогнозируют ответ пациента на терапию CTL019, представлены в таблице 8.

Таблица 7А: Иллюстративные гены, которые прогнозируют ответ пациента на терапию CTL019

Ген	Unigene	Номер доступа
ABCA7	Hs.134514	NM_019112
ABTB1	Hs.107812	NM_172027, NM_172028, NM_032548
ACOT9	Hs.298885	NM_001037171, NM_001033583
ACTA2	Hs.500483	NM_001141945, NM_001613
ADAMTS10	Hs.657508	NM_030957
ADD3	Hs.501012	NM_016824, NM_019903, NM_001121
ADPRH	Hs.99884	NM_001125
AEBP1	Hs.439463	NM_001129
AES	Hs.515053	NM_198970, NM_198969, NM_001130
AIM2	Hs.281898	NM_004833
ALAS1	Hs.476308	NM_199166, NM_000688
ALPK1	Hs.652825	NM_025144, NM_001102406
ALS2CL	Hs.517937	NM_147129, NM_182775
AMD1	Hs.159118	NM_001634, NM_001033059
ANKRD55	Hs.436214	NM_024669, NM_001039935
ANKZF1	Hs.437647	NM_018089, NM_001042410
ANTXR2	Hs.162963, Hs.720941	NM_001145794, NM_058172
ANXA2	Hs.591361, Hs.546235, Hs.511605	NM_004039, NM_001136015, NM_001002858, NM_001002857
ANXA2P2	Hs.534301	
APIG2	Hs.343244	NM_003917
APIM1	Hs.71040	NM_032493, NM_001130524
AP2A2	Hs.19121	NM_012305
APAF1	Hs.552567	NM_181869, NM_181868, NM_013229, NM_001160, NM_181861
APBA2	Hs.721380, Hs.618112	NM_001130414, NM_005503
APBB3	Hs.529449	NM_133174, NM_133173, NM_133172, NM_006051
AQP3	Hs.234642	NM_004925
ARFGAP2	Hs.436204	NM_032389
ARHGAP33	Hs.515364	NM_052948
ARHGEF1	Hs.631550	NM_004706, NM_199002, NM_198977
ARHGEF11	Hs.516954	NM_198236, NM_014784
ARHGEF18	Hs.465761	NM_001130955, NM_015318
ARL4C	Hs.723194, Hs.111554	NM_005737
ARPC5L	Hs.132499	NM_030978
ARRB1	Hs.625320, Hs.503284	NM_020251, NM_004041
ARRDC2	Hs.515249	NM_015683, NM_001025604
ARSB	Hs.604199, Hs.149103	NM_000046, NM_198709
ATOX1	Hs.125213	NM_004045
ATP13A3	Hs.529609	NM_024524
ATP1B3	Hs.477789	NM_001679
ATP2A2	Hs.506759	NM_001135765, NM_170665, NM_001681
ATP2B4	Hs.343522, Hs.511311	NM_001001396, NM_001684
ATP8B4	Hs.511311	NM_024837
ATXN7L3B	Hs.744849	NM_001136262
AVEN	Hs.555966	NM_020371

	B4GALT5	Hs.370487	NM_004776
	BATF	Hs.509964	NM_006399
	BCL9L	Hs.414740	NM_182557
	BEND5	Hs.475348	NM_024603
5	BEX4	Hs.184736	NM_001080425, NM_001127688
	BIN1	Hs.193163	NM_139350, NM_139348, NM_139349, NM_139343, NM_004305, NM_139345, NM_139344, NM_139347, NM_139351, NM_139346
	BNIP3L	Hs.131226	NM_004331
	BTN3A1	Hs.191510	NM_001145008, NM_007048, NM_194441, NM_001145009
10	C10orf128	Hs.385493	NM_001010863
	C11orf10	Hs.437779	NM_014206
	C11orf21	Hs.559181	NM_001142946
	C11orf35	Hs.669395	NM_173573
	C12orf5	Hs.504545	NM_020375
	C16orf54	Hs.331095	NM_175900
15	C16orf74	Hs.461655	NM_206967
	C17orf48	Hs.47668	NM_020233
	C17orf67	Hs.658949	NM_001085430
	C19orf29	Hs.267446	NM_001080543, NM_021231
	C1QBP	Hs.555866	NM_001212
	C20orf11	Hs.353013	NM_017896
20	C20orf112	Hs.516978	NM_080616
	C21orf2	Hs.517331	NM_004928
	C2orf67	Hs.591638, Hs.282260	NM_152519
	C3orf26		NM_001167924, NM_032359
	C4orf43		NM_018352
25	C5orf13	Hs.483067, Hs.36053, Hs.694860	NM_001142475, NM_001142476, NM_004772, NM_001142482, NM_001142477, NM_001142483, NM_001142478, NM_001142474, NM_001142481, NM_001142479, NM_001142480
	C5orf30	Hs.482976	NM_033211
	C5orf32	Hs.529798	NM_032412
	C5orf39	Hs.529385, Hs.721020	NM_0010104279
30	CABIN1	Hs.517478	NM_012295
	CACHD1	Hs.443891	NM_020925
	CADM1	Hs.370510	NM_014333, NM_001098517
	CAPG	Hs.516155	NM_001747
	CAPS	Hs.584744	NM_004058, NM_080590
	CASK	Hs.495984	NM_001126054, NM_001126055, NM_003688
35	CBX4	Hs.405046	NM_003655
	CCDC47	Hs.202011	NM_020198
	CCL17	Hs.546294	NM_002987
	CCL3	Hs.514107	NM_002983
	CCL4	Hs.75703	NM_002984
	CCR1	Hs.301921	NM_001295
40	CCT2	Hs.189772	NM_006431
	CCT3	Hs.491494	NM_001008800, NM_005998, NM_001008883
	CCT7	Hs.368149	NM_001009570, NM_006429, NM_001166284, NM_001166285
	CD248	Hs.195727	NM_020404
	CD40LG	Hs.592244	NM_000074
	CD58	Hs.34341	NM_001144822, NM_001779
45	CD70	Hs.715224, Hs.501497	NM_001252
	CD80	Hs.838	NM_005191
	CDC123	Hs.412842	NM_006023
	CDC25B	Hs.153752	NM_004358, NM_021872, NM_021873
	CDC42BPG	Hs.293590	NM_017525
	CDK7	Hs.184298	NM_001799

	CDKN1A	Hs.370771	NM_078467, NM_000389
	CDKN2A	Hs.512599	NM_058197, NM_058195, NM_000077
	CERK	Hs.200668	NM_022766
	CFP	Hs.53155	NM_001145252, NM_002621
5	CHAC2	Hs.585944	NM_001008708
	CHI3L2	Hs.514840	NM_001025199, NM_001025197, NM_004000
	CHMP7	Hs.5019	NM_152272
	CLDND1	Hs.531371	NM_001040181, NM_001040183, NM_001040200, NM_001040199, NM_001040182, NM_019895
	CLTC	Hs.491351	NM_004859
10	CNN3	Hs.483454	NM_001839
	CNOT8	Hs.26703	NM_004779
	CNPY3	Hs.414099	NM_006586
	COQ3	Hs.713623	NM_017421
	CSF1	Hs.591402	NM_000757, NM_172212, NM_172211, NM_172210
	CSF2	Hs.1349	NM_000758
15	CSNK2A1	Hs.654675, Hs.644056	NM_001895, NM_177560, NM_177559
	CST7	Hs.143212	NM_003650
	CTC1	Hs.156055	NM_025099
	CTDSP1	Hs.444468	NM_182642, NM_021198
	CTDSP2	Hs.524530	XM_001720210, XM_001722552, XM_002344384, XM_001725997, NM_005730
20	CTNNA1	Hs.656653, Hs.445981	NM_001903
	CTSL1	Hs.418123	NM_001912, NM_145918
	CUL9	Hs.485434	NM_015089
	CUTA	Hs.520070	NM_0014433, NM_001014840, NM_015921, NM_001014838, NM_0014837
	CYFIP1	Hs.26704	NM_014608, NM_001033028
	CYP2J2	Hs.152096	NM_000775
25	DBP	Hs.414480, Hs.528006	NM_001352
	DCAF11	Hs.525251	NM_001163484, NM_181357, NM_025230
	DCBLD2	Hs.203691	NM_080927
	DCHS1	Hs.199850	NM_003737
	DCTN6	Hs.158427	NM_006571
	DDX10	Hs.591931	NM_004398
30	DENND2D	Hs.557850	NM_024901
	DENND5A	Hs.501857	NM_015213
	DERL1	Hs.241576	NM_001134671, NM_024295
	DFNB31	Hs.93836	NM_001083885, NM_015404
	DGKD	Hs.471675	NM_152879, NM_003648
35	DGKZ	Hs.502461	NM_001105540, NM_003646, NM_201533, NM_201532
	DHRS2	Hs.272499	NM_182908, NM_005794
	DIABLO	Hs.169611	NM_138929, NM_019887
	DNAJB6	Hs.490745	NM_005494, NM_058246
	DPEP2	Hs.372633	NM_022355
	DUSP22	Hs.29106	NM_020185, XM_001718070
40	E2F6	Hs.603093	NM_198256
	EBNA1BP2	Hs.346868	NM_006824, NM_001159936
	EDARADD	Hs.352224	NM_080738, NM_145861
	EED	Hs.503510	NM_152991, NM_003797
	EEF1E1	Hs.602353, Hs.723203	NM_004280, NM_001135650
	EGFL6	Hs.12844	NM_001167890, NM_015507
45	EHD1	Hs.523774	NM_006795
	EIF2B3	Hs.533549	NM_001166588, NM_020365
	EIF2S1	Hs.151777	NM_004094
	ELL2	Hs.708710, Hs.192221	NM_012081
	EMP1	Hs.436298	NM_001423
	EPAS1	Hs.468410	NM_001430



	EPHA4	Hs.371218	NM_004438
	EPHX1	Hs.89649	NM_001136018, NM_000120
	EPPK1	Hs.200412	NM_031308
	ERGIC2	Hs.339453	NM_016570
5	ERGIC3	Hs.472558	NM_015966, NM_198398
	ERP29	Hs.75841	NM_001034025, NM_006817
	ETFA	Hs.39925	NM_001127716, NM_000126
	ETNK1	Hs.29464	NM_001039481, NM_018638
	ETV7	Hs.272398	NM_016135
	FAAH	Hs.720143	NM_001441
10	FABP5	Hs.408061	NM_001444
	FAF2	Hs.484242	NM_014613
	FAIM3	Hs.723317, Hs.58831	NM_001142472, NM_001142473, NM_005449
	FAM117B	Hs.471130	NM_173511
	FAM134B	Hs.711125	NM_001034850, NM_019000
	FAM13A	Hs.97270	NM_014883, NM_0015045
15	FAM193B	Hs.484289	NM_019057
	FAM40B	Hs.489988	NM_020704, NM_001134336
	FAM63A	Hs.723127	NM_018379, NM_001163260, NM_001163259, NM_001163258, NM_001040217
	FAM65B	Hs.559459	NM_014722, NM_015864
	FANCL	Hs.720331	NM_001114636, NM_018062
20	FANK1	Hs.352591	NM_145235
	FAR2	Hs.298851	NM_018099
	FAU	Hs.387208	NM_001997
	FCER1G	Hs.433300	NM_004106
	FCER2	Hs.465778	NM_002002
	FCGBP	Hs.111732	NM_003890, XM_001717543
25	FCHO1	Hs.96485	NM_001161358, NM_001161357, NM_001161359, NM_015122
	FCRL3	Hs.292449	NM_052939
	FGD3	Hs.411081	NM_033086, NM_001083536
	FGF9	Hs.111	NM_002010
	FKBP4	Hs.713721, Hs.524183	NM_002014
	FLOT2	Hs.514038	NM_004475
30	FLT3LG	Hs.428	NM_001459
	FLVCR2	Hs.615289, Hs.509966	NM_017791
	FOSL1	Hs.283565	NM_005438
	FOSL2	Hs.596972, Hs.220971	NM_005253
	FRAT1	Hs.126057	NM_005479
	GAL3ST4	Hs.44856	NM_024637
35	GALNT4	Hs.713979, Hs.25130	NM_003774
	GCLM	Hs.315562	NM_002061
	GCNT1	Hs.521568	NM_001490, NM_001097633, NM_001097635, NM_001097634, NM_001097636
	GFOD1	Hs.484686	NM_018988
	GFPT1	Hs.580300	NM_002056
40	GIPC3	Hs.266873	NM_133261
	GK	Hs.1466, Hs.654557	NM_001128127, NM_000167, NM_203391
	GLRX2	Hs.458283	NM_016066, NM_197962
	GMEB2	Hs.473286	NM_012384
	GNAI1	Hs.134587	NM_002069
	GPA33	Hs.651244	NM_005814
45	GPD1L	Hs.82432	NM_015141
	GPKOW	Hs.503666	NM_015698
	GPR125	Hs.99195	NM_145290
	GPR56	Hs.513633	NM_001145773, NM_001145774, NM_001145771, NM_001145772, NM_005682, NM_201525, NM_001145770, NM_201524

	GPSM3	Hs.520046	NM_022107
	GRAP	Hs.567416	NM_006613
	GRASP	Hs.407202	NM_181711
	GTF2A2	Hs.512934	NM_004492
5	HAVCR1	Hs.129711	NM_001099414, NM_012206
	HBS1L	Hs.378532	NM_001145207, NM_001145158, NM_006620
	HDAC9	Hs.196054	NM_014707, NM_178423, NM_178425, NM_058176, NM_058177
	HIGD1A	Hs.711098, Hs.593134, Hs.7917	NM_014056, NM_001099669, NM_001099668
	HIP1	Hs.329266, Hs.619089	NM_005338
	HLA-DMA	Hs.351279	NM_006120
10	HLA-DPA1	Hs.347270	NM_033554
	HLA-DQA2	Hs.591798	NM_020056
	HLA-DQB2	Hs.719990	NM_001198858, NM_001300790
	HLA-DRA	Hs.520048	NM_019111
	HLA-DRB1	Hs.716081, Hs.696211, Hs.723344, Hs.534322	NM_002124, NM_021983, XM_002346251
	HLA-DRB5	Hs.534322	NM_002125
15	HLF	Hs.196952	NM_002126
	HMOX1	Hs.517581	NM_002133
	HSPD1	Hs.595053, Hs.723164	NM_199440, NM_002156
	HSPE1	Hs.1197	NM_002157
	HYI	Hs.709864	NM_031207
	ICAM3	Hs.654563	NM_002162
20	IDUA	Hs.89560	NM_000203
	IER2	Hs.501629	NM_004907
	IFNAR2	Hs.708195	NM_207584, NM_207585, NM_000874
	IFNG	Hs.856	NM_207585
	IGF1R	Hs.643120, Hs.714012	NM_000875
	IGSF3	Hs.171057	NM_001007237, NM_001542
25	IGSF9B	Hs.204121	NM_014987
	IKBIP	Hs.252543	NM_201612, NM_201613, NM_153687
	IL10	Hs.193717	NM_000572
	IL11RA	Hs.591088	NM_004512, NM_147162, NM_001142784
	IL13	Hs.845	NM_002188
	IL15RA	Hs.524117	NM_002189, NM_172200
30	IL1RAP	Hs.478673	NM_134470, NM_001167930, NM_001167928, NM_001167929, NM_002182
	IL1RL1	Hs.66	NM_003856, NM_016232
	IL1RN	Hs.81134	NM_000577, NM_173841, NM_173842, NM_173843
	IL21	Hs.567559	NM_021803
	IL2RA	Hs.231367	NM_000417
35	IL2RB	Hs.474787	NM_000878
	IL3	Hs.694	NM_000588
	IL4	Hs.73917	NM_000589, NM_172348
	IL5	Hs.2247	NM_000879
	IL6ST	Hs.532082	NM_002184, NM_175767
	IL9	Hs.960	NM_000590
40	ING4	Hs.524210	NM_001127583, NM_001127582, NM_001127586, NM_001127585, NM_001127584, NM_016162
	INPP5A	Hs.523360, Hs.715308	NM_005539
	INTS1	Hs.532188	NM_001080453
	IRF2BP2	Hs.350268	NM_001077397, NM_182972
	ISOC1	Hs.483296	NM_016048
45	ITGA6	Hs.133397	NM_001079818, NM_000210
	ITPKB	Hs.528087, Hs.659396	NM_002221
	ITPR3	Hs.65758	NM_002224
	JAKMIP1	Hs.479066	NM_144720, NM_001099433
	KAT8	Hs.533803	NM_032188, NM_182958

	KCNK5	Hs.444448	NM_003740
	KCTD12	Hs.644125	NM_138444
	KIAA0020	Hs.493309	NM_014878
	KIAA0141	Hs.210532	NM_014773, NM_001142603
5	KIAA0664L3	Hs.715792	
	KIAA0748	Hs.33187	NM_001098815, NM_001136030
	KIAA1257	Hs.518247	NM_020741
	KIAA1279	Hs.279580	NM_015634
	KIAA1683	Hs.313471	NM_025249, NM_001145305, NM_001145304
	KIAA1797	Hs.136247	NM_017794
10	KIF3A	Hs.43670	NM_007054
	KIT	Hs.479754	NM_001093772, NM_000222, XM_001724747, XM_936229
	KLF2	Hs.107740	NM_016270
	KLF3	Hs.298658	NM_016531
	KPNA3	Hs.527919	NM_002267
	KRT72	Hs.662013	NM_080747, NM_001146226, NM_001146225
15	KRT73	Hs.55410	NM_175068
	LAIR1	Hs.572535	NM_002287, NM_021706
	LARP4	Hs.26613	NM_199188, NM_199190, NM_052879, NM_001170808, NM_001170803, NM_001170804
	LDLRAP1	Hs.590911	NM_015627
	LEF1	Hs.555947	NM_001166119, NM_001130713, NM_001130714, NM_016269
20	LGMN	Hs.18069	NM_001008530, NM_005606
	LIMA1	Hs.525419	NM_001113547, NM_001113546, NM_016357, NM_017806
	LIME1	Hs.233220	NM_017806
	LMBR1L	Hs.272838	NM_018113
	LMNA	Hs.594444	NM_005572, NM_170708, NM_170707
	LMO7	Hs.207631	NM_015842, NM_005358
25	LOC100289511	Hs.729250	XM_002347442, XM_002343308, XM_002344795
	LOC100302650	Hs.729719	
	LOC282997	Hs.599931	
	LOC283174	Hs.504370	
	LOC338799	Hs.524804	
	LOC541471	Hs.652166, Hs.652426, Hs.560805	
30	LOC728392	Hs.104305	NM_001162371
	LRCH4	Hs.719669, Hs.125742	NM_002319
	LRP8	Hs.576154	NM_001018054, NM_004631, NM_033300, NM_017522
	LRRN1	Hs.163244	NM_020873
	LSM14B	Hs.105379	NM_144703
	LTA	Hs.36	NM_001159740, NM_000595
35	LTBP3	Hs.289019	NM_001130144, NM_001164266, NM_021070
	LYPD3	Hs.631594	NM_014400
	MAF	Hs.134859	NM_005360, NM_001031804
	MAL	Hs.80395	NM_022438, NM_022439, NM_002371, NM_022440
	MAMLD1	Hs.20136	NM_005491
	MANF	Hs.436446	NM_006010
40	MAP2K6	Hs.463978	NM_002758
	MAP4K2	Hs.534341	NM_004579
	MARCKSL1	Hs.75061	NM_023009
	MCF2L	Hs.170422, Hs.597691	NM_001112732, NM_024979
	MDS2	Hs.523369	
	MED28	Hs.434075, Hs.644788	NM_025205
45	MED6	Hs.497353	NM_005466
	MEGF6	Hs.593645	NM_001409
	MEOX1	Hs.438	NM_001040002, NM_013999, NM_004527
	MFGE8	Hs.3745	NM_005928, NM_001114614
	MINPP1	Hs.121260	NM_004897

	MIR1182		
	MIR155		
	MIR155HG	Hs.697120	
	MLXIP	Hs.721711, Hs.437153	NM_014938
5	MOB1A	Hs.602092	NM_018221
	MPI	Hs.75694	NM_002435
	MPRIP	Hs.462341, Hs.646854	NM_201274, NM_015134
	MRPL13	Hs.333823	NM_014078
	MRPL22	Hs.483924	NM_014180, NM_001014990
	MRPL33	Hs.515879	NM_145330, NM_004891
10	MRPL39	Hs.420696	NM_017446, NM_080794
	MRPL42	Hs.199579	NM_014050, NM_172177, NM_172178
	MRPS28	Hs.521124	NM_014018
	MSC	Hs.442619	NM_005098
	MSL1	Hs.532786	NM_001012241
	MTCH2	Hs.269944	NM_014342
15	MYADM	Hs.380906	NM_001020819, NM_001020818, NM_001020821, NM_001020820, NM_138373
	MYCBP2	Hs.591221	NM_015057
	MYO15B	Hs.390817	
	MYOF	Hs.602086	NM_013451, NM_133337
	MZF1	Hs.399810	NM_198055, NM_003422
20	NAA50	Hs.596074	NM_025146
	NCKAP1	Hs.603732	NM_205842, NM_013436
	NDRG2	Hs.525205	NM_201540, NM_201541, NM_201539, NM_201538, NM_201537, NM_201536, NM_201535, NM_016250
	NDUFAB1	Hs.189716	NM_005003
	NDUFAF1	Hs.106529	NM_016013
	NDUFV2	Hs.464572	NM_021074
25	NEDD9	Hs.37982	NM_182966, NM_001142393, NM_006403
	NEK7	Hs.723303, Hs.24119	NM_133494
	NELL2	Hs.505326	NM_006159, NM_001145110, NM_001145108, NM_001145109, NM_001145107
	NFATC1	Hs.701518, Hs.534074	NM_172388, NM_172387, NM_172389, NM_006162, NM_172390
30	NIPA1	Hs.511797	NM_144599, NM_001142275
	NIPAF3	Hs.523442	NM_020448
	NEN	Hs.247460	NM_020726
	NME1	Hs.463456	NM_198175, NM_001018138, NM_000269, NM_001018139, NM_002512, NM_001018137, NM_001018136
	NME1-NME2	Hs.463456	NM_198175, NM_001018138, NM_001018139, NM_001018137, NM_001018136, NM_000269, NM_002512
35	NME7	Hs.706952	NM_013330, NM_197972
	NPEPPS	Hs.443837, Hs.449880	NM_006310, XM_001725441, XM_001725426
	NQO1	Hs.406515	NM_001025434, NM_001025433, NM_000903
	NRCAM	Hs.21422	NM_001037132, NM_001037133, NM_005010
	NSDHL	Hs.57698	NM_015922, NM_001129765
	NSMAF	Hs.372000	NM_003580, NM_001144772
40	NT5DC3	Hs.48428	NM_001031701
	NUBP1	Hs.81469	NM_002484
	NUCB2	Hs.654599	NM_005013
	NUMA1	Hs.325978	NM_006185
	NUP153	Hs.601591, Hs.718703	NM_005124
45	OASL	Hs.118633	NM_198213, NM_003733
	ODC1	Hs.467701	NM_002539
	OLFM2	Hs.169743	NM_058164
	OSBPL7	Hs.463320	NM_145798
	OTUD7B	Hs.98322	NM_020205
	P2RY8	Hs.111377	NM_178129

	P4HA2	Hs.519568	NM_001017974, NM_001017973, NM_001142598, NM_001142599, NM_004199
	PAM	Hs.369430	NM_138766, NM_000919, NM_138822, NM_138821
	PAN2	Hs.273397	NM_014871, NM_001166279, NM_001127460
	PANX2	Hs.440092	NM_001160300, NM_052839
5	PAPD7	Hs.481542	NM_006999, NM_001171806, NM_001171805
	PARK7	Hs.419640	NM_007262, NM_001123377
	PBX4	Hs.466257	NM_025245
	PCIF1	Hs.716563	NM_022104
	PCSK5	Hs.368542	NM_006200
10	PDE4A	Hs.89901	NM_001111308, NM_006202, NM_001111307, NM_001111309
	PDIA6	Hs.212102	NM_005742
	PDK1	Hs.470633	NM_002610
	PEA15	Hs.517216	NM_003768
	PFKM	Hs.75160	NM_001166688, NM_001166686, NM_001166687, NM_000289
	PGAM1	Hs.592599, Hs.632918	NM_002629
15	PGAM2	Hs.632642	NM_000290
	PGAM4	Hs.632822	NM_001029891
	PHKA2	Hs.54941	NM_000292
	PHFPP1	Hs.465337	NM_194449
	PHFPP2	Hs.709458	NM_015020
	PICAFM	Hs.163893	NM_001008660, NM_007166
20	PIK3R5	Hs.278901	NM_001142633, NM_014308
	PIP4K2A	Hs.57079	NM_005028
	PITPNM2	Hs.272759	NM_020845
	PFAA	Hs.27182	NM_001031689
	PFCG1	Hs.268177	NM_182811, NM_002660
	PFCH2	Hs.170156	NM_014638
25	PNISR	Hs.520287, Hs.644863	NM_015491, NM_032870,
	POMP	Hs.268742	NM_015932
	PPFIBP2	Hs.655714	NM_003621
	PPIF1	Hs.27693	NM_016059
	PPP2R1B	Hs.584790	NM_002716, NM_181699
30	PPP2R2B	Hs.655213	NM_181676, NM_181675, NM_181674, NM_181678, NM_181677, NM_004576, NM_001127381
	PPP6R2	Hs.449098, Hs.733531, Hs.740776	NM_001242898, NM_001242899, NM_001242900, NM_014678
	PPPDE2	Hs.570455	NM_015704
	PRDM1	Hs.436023	NM_182907, NM_001198
	PRDX4	Hs.83383	NM_006406
	PREP	Hs.436564	NM_002726
35	PRKAR1B	Hs.520851	NM_001164760, NM_002735, NM_001164758, NM_001164759, NM_001164762, NM_001164761
	PRKCZ	Hs.496255	NM_001033581, NM_002744, NM_001033582
	PRR5	Hs.720401, Hs.102336	NM_001017530, NM_181333, NM_181334, NM_181335, NM_015366, NM_001017526, NM_001017529, NM_001017528
	PRSS23	Hs.25338	NM_007173
40	PSMA1	Hs.102798	NM_001143937, NM_148976, NM_002786
	PSMB1	Hs.352768	NM_002793
	PSMC2	Hs.437366	NM_002803
	PSMD1	Hs.3887	NM_002807
	PSMD11	Hs.655396	NM_002815
	PSMD14	Hs.567410	NM_005805
	PSMD5	Hs.193725	NM_005047
45	PTP4A3	Hs.43666	NM_007079, NM_032611
	PTPLA	Hs.114062	NM_014241
	PTPN6	Hs.63489	NM_002831, NM_080548, NM_080549
	PTRH2	Hs.12677	NM_016077
	PUS7	Hs.520619	NM_019042

	PYCARD	Hs.499094	NM_145182, NM_013258
	R3HDM2	Hs.443673	NM_014925
	RAB1A	Hs.310645	NM_004161, NM_015543
	RAB21	Hs.524590	NM_014999
5	RAB23	Hs.555016	NM_016277, NM_183227
	RAB33A	Hs.654356	NM_004794
	RAB37	Hs.351413	NM_001163990, NM_001163989, NM_175738, NM_001006638
	RAB43	Hs.546542, Hs.723723	XM_001723593, XM_001720383, XM_001724346, NM_198490, XM_002342369
	RABGGTB	Hs.78948	NM_004582
10	RAD50	Hs.655835	NM_133482, NM_005732
	RAPGEF6	Hs.483329	NM_001164386, NM_001164387, NM_001164388, NM_001164389, NM_001164390, NM_016340
	RASA3	Hs.593075	NM_007368
	RASGRP2	Hs.99491	NM_153819, NM_001098670, NM_001098671
	RBBP8	Hs.546282	NM_002894, NM_203292, NM_203291
15	RBKS	Hs.11916	NM_022128
	REEP5	Hs.429608	NM_005669
	RGS1	Hs.75256	NM_002922
	RGS14	Hs.9347	NM_006480
	RHOT2	Hs.513242	NM_138769
	RNF19A	Hs.292882	NM_015435, NM_183419
20	RNF213	Hs.195642	NM_020914, NM_020954, XM_002343588
	RNF34	Hs.292804	NM_194271, NM_025126
	RPF2	Hs.372265	NM_032194
	RPP25	Hs.8562	NM_017793
	RYBP	Hs.7910	NM_012234
25	S1PR1	Hs.154210	NM_001400
	S1PR4	Hs.662006	NM_003775
	SCML4	Hs.486109	NM_198081
	SDHB	Hs.465924	NM_003000
	SDK2	Hs.435719	NM_001144952
30	SEC24D	Hs.189641	NM_014822
	SEC31B	Hs.18889	NM_015490
	SELL	Hs.728756	NM_000655
	SELP	Hs.73800	NM_003005
	SEPT11	Hs.128199	NM_018243
	SEPT3	Hs.120483	NM_019106, NM_145733
35	SEPT9	Hs.440932	NM_001113491, NM_001113492, NM_001113493, NM_001113494, NM_001113495, NM_001113496, NM_001293695, NM_001293696, NM_001293697, NM_001293698, NM_006640,
	SERPINF1	Hs.532768	NM_002615
	SERPINF2	Hs.159509	NM_001165920, NM_001165921, NM_000934
	SF1	Hs.502829	NM_004630, NM_201995, NM_201997, NM_201998
	SFXN1	Hs.369440	NM_022754
40	SH2B1	Hs.723196	NM_001145797, NM_015503, NM_001145795, NM_001145796, NM_001145812
	SHC1	Hs.433795	NM_001130040, NM_003029, NM_001130041, NM_183001
	SIGIRR	Hs.501624	NM_021805, NM_001135054, NM_001135053
	SIRPG	Hs.590883	NM_080816, NM_018556, NM_001039508
	SLC16A1	Hs.75231	NM_001166496, NM_003051
	SLC16A10	Hs.591327	NM_018593
45	SLC1A4	Hs.654352	NM_003038, NM_001135581
	SLC24A6	Hs.286194	NM_024959
	SLC25A17	Hs.474938	NM_006358
	SLC25A32	Hs.607819	NM_030780
	SLC26A11	Hs.4866	NM_173626, NM_001166348, NM_001166347, NM_001166349
	SLC27A2	Hs.720807	NM_003645, NM_001159629

	SLC2A1	Hs.473721	NM_006516
	SLC2A4RG	Hs.435126	NM_020062
	SLC2A8	Hs.179522	NM_014580
	SLC35F2	Hs.524014	NM_017515
5	SLC39A14	Hs.491232	NM_001128431, NM_015359, NM_001135153, NM_001135154
	SLC39A8	Hs.288034	NM_022154, NM_001135148, NM_001135147, NM_001135146
	SLC40A1	Hs.643005	NM_014585
	SLC43A3	Hs.99962	NM_199329, NM_017611, NM_014096
	SLIRP	Hs.655105	NM_001267863, NM_001267864, NM_031210
	SNPH	Hs.713451, Hs.323833	NM_014723, NM_001136566
10	SNRK	Hs.476052	NM_017719, NM_001100594
	SNRPG	Hs.631639, Hs.654528, Hs.516076, Hs.465167	NM_003096, XM_002347904, NM_001146693, XM_002343626, XM_001723258
	SNX24	Hs.483200	NM_014035
	SOAT1	Hs.496383	NM_003101
	SORD	Hs.878, Hs.633539	NM_003104
15	SOX4	Hs.643910	NM_003107
	SP140L	Hs.662198	NM_138402
	SPATS2L	Hs.120323	NM_001100424, NM_001100423, NM_001100422, NM_015535
	SPG7	Hs.185597	NM_003119, NM_199367
	SPR	Hs.301540	NM_003124
	SPSB3	Hs.592080	NM_080861
20	SPTBN1	Hs.503178, Hs.705692	NM_003128, NM_178313
	SRGN	Hs.1908	NM_002727
	SRSF5	Hs.632326	NM_001039465, NM_006925
	SRXN1	Hs.719997, Hs.516830	NM_080725
	SSH1	Hs.199763	NM_001161331, NM_001161330, NM_018984
	ST8SIA4	Hs.308628	NM_175052, NM_005668
25	STAC	Hs.56045	NM_003149
	STAT6	Hs.524518	NM_003153
	STIP1	Hs.337295	NM_006819
	STMN3	Hs.639609	NM_015894
	STRAP	Hs.504895	NM_007178
	STT3A	Hs.504237	NM_152713
30	STX16	Hs.307913	NM_001134772, NM_001134773, NM_003763, NM_001001433
	SULT1B1	Hs.129742	NM_014465
	SUN1	Hs.438072	NM_001171944, NM_001171946, NM_001171945, NM_001130965, NM_025154
	SUN2	Hs.517622	NM_015374
	SVIL	Hs.499209	NM_003174, NM_021738
35	SYT11	Hs.32984	NM_152280
	SYTL1	Hs.469175	NM_032872
	SYTL3	Hs.436977	NM_001009991
	TACC3	Hs.104019	NM_006342
	TANK	Hs.132257	NM_004180, NM_133484
40	TBCC	Hs.75064	NM_003192
	TBX21	Hs.272409	NM_013351
	TCEA3	Hs.446354	NM_003196
	TCF20	Hs.475018	NM_181492, NM_005650
	TCF7	Hs.573153	NM_201633, NM_201632, NM_001134851, NM_001134852, NM_213648, NM_003202, NM_201634
	TFRC	Hs.529618	NM_001128148, NM_003234
45	THNSL1	Hs.645274	NM_024838
	TIGIT	Hs.421750	NM_173799
	TIMD4	Hs.334907	NM_001146726, NM_138379
	TJP3	Hs.25527	NM_014428
	TMC6	Hs.632227	NM_001127198, NM_007267
	TMC8	Hs.592102	NM_152468

	TMCC2	Hs.6360	NM_014858
	TMED2	Hs.75914, Hs.592682	NM_006815
	TMEM110	Hs.556077, Hs.705605	NM_198563, NM_205853
	TMEM123	Hs.503709	NM_052932
5	TMEM165	Hs.479766	NM_018475
	TMEM220	Hs.462230	NM_001004313
	TMEM33	Hs.31082	NM_018126
	TMEM63A	Hs.119387	NM_014698
	TMEM66	Hs.521487	NM_016127
	TMEM70	Hs.106650	NM_017866, NM_001040613
10	TMEM71	Hs.293842	NM_144649, NM_001145153
	TMIGD2	Hs.263928	NM_001169126, NM_144615
	TNFRSF11A	Hs.204044	NM_003839
	TNFRSF1B	Hs.256278	NM_001066
	TNFRSF8	Hs.1314	NM_152942, NM_001243
	TNFRSF9	Hs.654459	NM_001561
15	TNNT3	Hs.73454	NM_006757, NM_001042782, NM_001042780, NM_001042781
	TOP2B	Hs.475733	NM_001068
	TPM2	Hs.300772	NM_213674, NM_003289, NM_001145822
	TRAPPC6A	Hs.466929	NM_024108
	TRIB2	Hs.627749, Hs.467751	NM_021643
	TRIM22	Hs.501778, Hs.684559	NM_006074
20	TRIP12	Hs.591633	NM_004238
	TRMT5	Hs.380159	NM_020810
	TSC2	Hs.90303	NM_001077183, NM_001114382, NM_000548
	TSPAN18	Hs.592575, Hs.385634	NM_001031730, NM_130783
	TSPAN32	Hs.271954	NM_139022
	TTC4	Hs.720251	NM_004623
25	TTC9	Hs.79170	NM_015351
	TTN	Hs.134602	NM_133432, NM_133379, NM_133378, NM_133437, NM_003319
	TWIST1	Hs.66744	NM_000474
	TXK	Hs.479669	NM_003328
	TXN	Hs.435136	NM_003329
	TXNDC5	Hs.719272, Hs.150837	NM_001145549, NM_201280, NM_030810
30	UBASH3B	Hs.444075	NM_032873
	UBE2E2	Hs.595802, Hs.475688	NM_152653
	UBE2Z	Hs.514297	NM_023079
	UCHL3	Hs.162241	NM_006002
	UCK2	Hs.458360	NM_012474
35	UHRF1BPIL	Hs.620701	NM_001006947, NM_015054
	USP19	Hs.255596	NM_006677
	USP53	Hs.595368, Hs.431081	NM_019050
	UXS1	Hs.469561	NM_025076
	UXT	Hs.172791	NM_004182, NM_153477
	VDR	Hs.524368	NM_001017535, NM_000376
40	VILL	Hs.103665	NM_015873
	VIPR1	Hs.348500	NM_004624
	VSIG1	Hs.177164	NM_001170553, NM_182607
	VTRNA1-3		
	WDR12	Hs.73291	NM_018256
	WNT7A	Hs.72290	NM_004625
45	WRB	Hs.198308	NM_001146218, NM_004627
	XAF1	Hs.441975	NM_017523, NM_199139
	YPEL3	Hs.513491	NM_031477, NM_001145524
	YWHAE	Hs.591239, Hs.513851	NM_006761
	YWHAG	Hs.520974	NM_012479
	ZBTB22	Hs.206770	NM_005453, NM_001145338



	ZBTB38	Hs.723156	NM_001080412
	ZC3H12C	Hs.376289	NM_033390
	ZDHHC16	Hs.76662	NM_032327, NM_198046, NM_198045, NM_198044, NM_198043
	ZFP36L2	Hs.503093	NM_006887
5	ZGPAT	Hs.590868	NM_181485, NM_001083113, NM_032527
	ZMAT1	Hs.496512	NM_032441, NM_001011657
	ZNF193	Hs.100921	NM_006299
	ZNF238	Hs.69997	NM_205768, NM_006352
	ZNF282	Hs.657701	NM_003575
	ZNF331	Hs.185674	NM_018555, NM_001079907, NM_001079906
10	ZNF506	Hs.351906	NM_001145404, NM_001099269
	ZNF542	Hs.467326	
	ZNF673	Hs.632800	NM_017776, NM_001129900, NM_001129898, NM_001129899
	ZNF688	Hs.301463, Hs.513509	NM_152458, NM_145271, NM_001024683
	ZNF710	Hs.459311	NM_198526
15	ZNF83	Hs.710125, Hs.665751, Hs.467210, Hs.659798	NM_018300, NM_001105550, NM_001105552, NM_001105551, NM_001105554, NM_001105553, NM_001105549
	ZSWIM1	Hs.517075	NM_080603

Наиболее значительные гены в таблице 7А были определены как гены с 1) абсолютным кратным изменением между ALL CR/CLL CR и CLL NR, превышающим 2, и 2) значением  $p$  для корреляции ответа и экспрессии, составляющим менее 0,01. Тридцать четыре гена, приведенных в таблице 7В ниже, удовлетворяли этим критериям и экспрессию этих генов измеряли на четырех дополнительных платформах для сравнения и валидации данных RNAseq. Эти четыре платформы представляли собой OpenArray, Fluidigm, Nanostring и q-ПЦР. Результаты этого эксперимента по сравнению платформ подтвердили результаты и заключения, описанные в настоящем описании. В таблице 7В также указано, происходит ли активация каждого гена у полностью отвечающих индивидуумов (CR) относительно не отвечающих индивидуумов, или происходит ли их активация у не отвечающих индивидуумов (NR) относительно полностью отвечающих индивидуумов. Иллюстративная публикация, в которой описана последовательность каждого гена, также приведена в таблице 7В, и каждая публикация включена в качестве ссылки в полном объеме, включая все последовательности нуклеиновых кислот и белков в ней.

Таблица 7В. Отдельные гены из таблицы 7А

Таблица 7В	Ген	Unigene	Номер доступа	Иллюстратив-ные публикации	Активиро-ваны у CR или NR
35	ALS2CL	Hs.517937	NM_147129, NM_182775	Jouan et al., Behav Brain Funct 9, 9 (2013)	CR
	AQP3	Hs.234642	NM_004925	Xie et al., Arch. Dermatol. Res. 305 (5), 397-406 (2013)	CR
	C16orf74	Hs.461655	NM_206967	Kim et al., PLoS ONE 5 (12), E15260 (2010)	CR
40	CCL17	Hs.546294	NM_002987	Lee et al, Pediatr. Res. 74 (5), 545-551 (2013)	NR
	CD248	Hs.195727	NM_020404	Kontsekova et al., Int. J. Oncol. 41 (4), 1365-1372 (2012)	CR
	CSF2	Hs.1349	NM_000758	Sawada et al., J. Exp. Med. 211 (2), 263-280 (Feb 2014)	NR
45	DHRS2	Hs.272499	NM_182908, NM_005794	Prunotto et al., J Proteomics 82, 193-229 (2013)	NR
	DPEP2	Hs.372633	NM_022355	Wilier et al., Nat. Genet. 40 (2), 161-169 (2008)	CR
	EPAS1	Hs.468410	NM_001430	Mathew et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111 (1), 291-296 (Jan 2014)	NR

	EPHA4	Hs.371218	NM_004438	Xu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110(36), 14634-14639 (2013)	CR
	FAIM3	Hs.723317, Hs.58831	NM_001142472, NM_001142473, NM_005449	Murakami et al., J. Immunol. 189 (2), 587-597 (2012)	CR
5	FAM134B	Hs.711125	NM_001034850, NM_019000	Murphy et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. 83 (1), 119-120 (2012)	CR
	GPA33	Hs.651244	NM_005814	Deng et al. PLoS ONE 8 (11), E79629 (2013)	CR
	IL13	Hs.845	NM_002188	Jiang et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 305 (11), E1359-E1366(2013)	NR
10	IL3	Hs.694	NM_000588	Miyake et al., Цитокин 64 (1), 86-89 (2013)	NR
	IL9	Hs.960	NM_000590	Jabeen et al., J. Clin. Invest. 123 (11), 4641-4653 (2013)	NR
	KRT72	Hs.662013	NM_080747, NM_001146226, NM_001146225	Principe et al., Proteomics 13 (10-11), 1667-1671 (2013)	CR
15	KRT73	Hs.55410	NM_175068	De Mateo et al., Proteomics 11 (13), 2714-2726 (2011)	CR
	LTA	Hs.36	NM_001159740, NM_000595	Stuart et al., Twin Res Hum Genet 16 (6), 1079-1086 (2013)	NR
	MCF2L	Hs.170422, Hs.597691	NM_001112732, NM_024979	Valdes et al., Ann. Rheum. Dis. 71 (9), 1537-1540 (2012)	CR
	MDS2	Hs.523369		Meyer et al., PLoS Genet. 6 (8) (2010)	CR
20	MEGF6	Hs.593645	NM_001409	Nakayama et al. Genomics 51 (1), 27-34 (1998)	CR
	MIR155			Weber et al., FEBS J. 272 (1), 59-73 (2005)	NR
	PPFIBP2	Hs.655714	NM_003621	Bohm et al., Oncol. Rep. 28 (2), 429-438 (2012)	CR
25	SCML4	Hs.486109	NM_198081	Vieira et al., Genet. Med. 10 (9), 668-674 (2008)	CR
	SDK2	Hs.435719	NM_001144952	Otowa et al., J. Hum. Genet. 54 (2), 122-126 (2009)	CR
	SPR	Hs.301540	NM_003124	Yang et al., J. Biol. Chem. 288 (26), 19221-19237 (2013)	NR
	SULT1B1	Hs.129742	NM_014465	Ross et al., Nat. Genet. 41 (12), 1345-1349 (2009)	CR
30	TCF7	Hs.573153	NM_201633, NM_201632, NM_001134851, NM_001134852, NM_213648, NM_003202, NM_201634	Nikuseva-Martic et al., Pathol. Oncol. Res. 19 (3), 545-551 (2013)	CR
	TNFRSF8	Hs.1314	NM_152942, NM_001243	Yao et al., Am. J. Surg. Pathol. 37 (9), 1407-1412 (2013)	NR
35	TSPAN18	Hs.592575, Hs.385634	NM_001031730, NM_130783	Yuan et al., PLoS ONE 8 (3), E58785 (2013)	CR
	TWIST1	Hs.66744	NM_000474	Zhou et al., J. Exp. Clin. Cancer Res. 33, 12 (Jan 2014)	NR
	VIPR1	Hs.348500	NM_004624	Bono et al., Cancer Cell 23 (4), 477-488 (2013)	CR
	VSIG1	Hs.177164	NM_001170553, NM_182607	Chen et al., J Surg Oncol 106 (3), 286-293 (2012)	CR

40 Также оценивали маркеры клеточной поверхности, различающие подгруппы Т-клеток памяти, которые описаны в Maus et al. (Annu. Rev. Immunol. 2014) и которые не были включены в наборы генов Gattinoni. Среди прочих, KLRG1 был идентифицирован как ген, экспрессия которого возрастает в образцах, полученных посредством афереза, в направлении ALL→CLL CR→CLL PR→CLL NR. Уровни экспрессии KLRG1

45 прогнозируют ответ пациента на терапию CTL019. По меньшей мере CD57, CD27, CD122 и CD62L были идентифицированы в качестве биомаркеров ответа в образцах продукта. Среди прочего уровни экспрессии CD57, CD27, CD122 и CD62L прогнозируют ответ пациента на терапию CTL019.

В одном варианте осуществления генная сигнатура полностью отвечающего (CR) индивидуума включает один или несколько профилей биомаркеров, описанных в таблице 9.

Таблица 9: Иллюстративный профиль биомаркеров полностью отвечающего индивидуума на терапию CAR19

Таблица 9: Иллюстративный профиль биомаркеров полностью отвечающего индивидуума на терапию CAR19	
CD27+	PD1-
CD8+	LAG3-
	TIM3-
	KLRG1-
Иллюстративные типы клеток CR	
Покоящиеся эффекторные Т-клетки (T <sub>EM</sub> )	
Покоящиеся T <sub>REG</sub>	
Наивные CD4+	
Нестимулированные Т-клетки памяти (T <sub>SCM</sub> )	
Ранние Т-клетки памяти	

В одном варианте осуществления генная сигнатура не отвечающих (NR) индивидуумов включает один или несколько профилей биомаркеров, описанных в таблице 10.

Таблица 10: Иллюстративный профиль биомаркеров не отвечающих индивидуумов на терапию CAR19

Таблица 10: Иллюстративный профиль биомаркеров не отвечающих индивидуумов на терапию CAR19	
PD1+	CD27-
LAG3+	
TIM3+	
KLRG1+	
Иллюстративные типы клеток NR	
Активированные эффекторные Т-клетки (T <sub>EM</sub> )	
Активированные T <sub>REG</sub>	
Активированные T <sub>H1</sub>	
Покоящиеся T <sub>H2</sub>	
Стимулированные Т-клетки памяти (T <sub>SCM</sub> )	
Поздние Т-клетки памяти	

На основе понимания биологии, комбинации генов, полученные посредством несмещенной селекции признаков, наборы генов и выбранные представляющие интерес гены можно использовать для дальнейшего различения NR, PR и CR.

Ранее описанная работа была расширена посредством исследования образцов 35 индивидуумов с CLL. Эта группа из 35 индивидуумов включает 21 индивидуума CLL в предшествующем исследовании, с всего 5 CR, 9 PR и 21 NR. В этом исследовании образцы произведенного продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19, собирали и культивировали в течение ночи с контрольными гранулами. Были идентифицированы новые генные сигнатуры на основе уровней экспрессии мРНК, которые прогнозируют ответ пациента. Перечень генов для сравнения CR против NR (N=185) приведен в таблице 18.

Таблица 18. Перечень генов для сравнения CR и NR

Ген	Unigene	Номер доступа №	FDR
ABCB1	Hs.489033	NM_000927	0,0492
ACSL1	Hs.406678	NM_001995, NM_001286711, NM_001286708, NM_001286710, NM_001286712	0,0362

	ADAM12		NM_003474, NM_001288973, NM_021641, NM_001288974, NM_001288975	0,0089
	ADAM23		NM_003812	0,0185
	ADCY1	Hs.192215	NM_001281768, NM_021116	0,0203
	AFAP1	Hs.529369	NM_198595, NM_001134647	0,0884
5	AGRN	Hs.273330	NM_198576, NM_001305275	0,0212
	ANKRD33B	Hs.26039	NM_001164440	0,0097
	APLP2	Hs.370247	NM_001142277, NM_001642, NM_001142278, NM_001142276, NM_001243299	0,0429
	AQPEP			0,0615
	ARHGAP32	Hs.440379	NM_001142685, NM_014715	0,0675
10	ART3	Hs.731997	NM_001130017, NM_001130016, NM_001130016, NM_001179	0,0890
	ATN1	Hs.143766	NM_001007026, NM_001940	0,0675
	ATP9A	Hs.649234	NM_006045	0,0029
	B4GALNT1	Hs.159481	NM_001478, NM_001276468, NM_001276469	0,0104
	B4GALT6		NM_004775	0,0965
	C1orf198	Hs.520494	NM_032800, NM_001136494, NM_001136495	0,0047
15	C21orf63			0,0029
	C5orf39			0,0047
	C9orf142		NM_183241	0,0870
	CACNB2	Hs.59093	NM_201596, NM_201593, NM_201597, NM_201571, NM_001167945, NM_201572, NM_000724, NM_201590, NM_201570	0,0615
20	CAMK2G		NM_001222, NM_172173, NM_172169, NM_172170, NM_001204492, NM_172171	0,0675
	CAMSAP2	Hs.23585	NM_203459, NM_001297708, NM_001297707	0,0797
	CCDC74A	Hs.351461	NM_138770, NM_001258304, NM_001258306, NM_001258305	0,0492
	CCL22	Hs.534347	NM_002990	0,0666
	CCL5		NM_002985, NM_001278736	0,0615
	CD109	Hs.399891	NM_133493, NM_001159588, NM_001159587	0,0423
25	CD200		NM_001004196, NM_005944	0,0299
	CD27	Hs.355307	NM_001242	0,0225
	CD52		NM_001803	0,0172
	CDKN1A	Hs.370771	NM_000389, NM_001220778, NM_001220777, NM_078467	0,0450
	CERS6	Hs.743222	NM_203463, NM_001256126	0,0384
	CHST2	Hs.8786	NM_004267	0,0063
30	CNTNAP2	Hs.655684	NM_014141	0,0872
	CPA5	Hs.567642	NM_001127442, NM_080385, NM_001127441	0,0433
	CPM	Hs.654387	NM_001005502, NM_198320, NM_001874, NM_001005502, NM_198320, NM_001874	0,0466
	CR1		NM_000573, NM_000651	0,0891
35	CTNNA1	Hs.445981, Hs.740112	NM_001903, NM_001290310, NM_001290309, NM_001290307, NM_001290312	0,0148
	CXCL9	Hs.77367	NM_002416	0,0299
	CXCR5		NM_001716	0,0939
	DBN1		NM_004395, NM_080881	0,0492
	DEPDC7	Hs.280990	NM_001077242, NM_139160	0,0256
	DIRC3			0,0890
40	DLG2	Hs.367656	NM_001364, NM_001142702, NM_001142699, NM_001142700, NM_001300983, NM_001206769	0,0085
	DNAJC12	Hs.260720	NM_021800, NM_201262	0,0891
	DRAM1	Hs.525634	NM_018370	0,0376
	DSG2	Hs.412597	NM_001943	0,0384
	DUSP4		NM_001394, NM_057158	0,0148
45	EBI3		NM_005755	0,0063
	EEF1A2	Hs.433839	NM_001958	0,0497
	EEF1DP3			0,0939
	EHD4		NM_139265	0,0415
	EMP1		NM_001423	0,0541

	ENPP2	Hs.190977	NM_006209, NM_001130863, NM_001040092	0,0870
	EPAS1	Hs.468410	NM_001430	0,0149
	ERP29		NM_006817, NM_001034025	0,0615
	EVC	Hs.646899	NM_001306090, NM_153717, NM_001306092	0,0666
5	EVI5	Hs.594434	NM_005665, NM_001308248	0,0373
	FADS2		NM_001281501, NM_001281502, NM_004265	0,0764
	FAM134B	Hs.481704	NM_019000, NM_001034850	0,0452
	FAM40B			0,0148
	FAM65C	Hs.372578	NM_001290268, NM_080829	0,0615
	FASN	Hs.83190	NM_004104	0,0884
10	FKBP11		NM_001143781, NM_016594, NM_001143782	0,0407
	FLT1	Hs.594454	NM_002019, NM_001160030, NM_001159920, NM_001160031	0,0699
	FLT3LG		NM_001204502, NM_001459, NM_001278637, NM_001278638, NM_001204503	0,0408
	FOXP1		NM_032682, NM_001244816, NM_001244815, NM_001244814, NM_001244808, NM_001244812, NM_001012505, NM_001244813, NM_001244810	0,0615
15	FSCN1	Hs.118400	NM_003088	0,0694
	GAS8	Hs.431792, Hs.739124	NM_001481, NM_001286209, NM_001286205, NM_001286208	0,0811
	GEM	Hs.654463	NM_181702, NM_005261	0,0275
	GNA12	Hs.487341	NM_007353, NM_001282441, NM_001282440	0,0360
	GPR56			0,0122
	GZMA		NM_006144	0,0805
20	HCST		NM_014266, NM_001007469	0,0212
	HDC	Hs.1481	NM_002112, NM_001306146	0,0890
	HSH2D	Hs.631617	NM_032855	0,0243
	ILIA		NM_000575	0,0148
	ILIRN		NM_173843, NM_173841, NM_000577, NM_173842	0,0615
	IL26	Hs.272350	NM_018402	0,0718
25	ILDR2	Hs.133153, Hs.730291	NM_199351	0,0860
	KLRB1	Hs.169824	NM_002258	0,0074
	KLRC3	Hs.654362	NM_002261, NM_007333	0,0035
	LHFP	Hs.507798	NM_005780	0,0053
	LIFR	Hs.133421, Hs.616721	NM_002310, NM_001127671	0,0362
30	LINC00476			0,0299
	LMCD1		NM_014583, NM_001278235, NM_001278233, NM_001278234	0,0423
	LMNA	Hs.594444	NM_001282625, NM_005572, NM_170707, NM_001282626, NM_001257374, NM_001282624, NM_170708	0,0677
	LOC347411			0,0407
	LOC619207			0,0407
	LRIG3		NM_001136051, NM_153377	0,0746
35	LRP1B	Hs.656461	NM_018557	0,0615
	LRRC4C	Hs.745123	NM_001258419, NM_020929	0,0733
	LY9	Hs.403857	NM_001261456, NM_001261457, NM_002348, NM_001033667	0,0615
	MAST2	Hs.319481	NM_015112	0,0959
	MGAT4A	Hs.177576	NM_001160154, NM_012214	0,0085
	MOB1B	Hs.691454	NM_173468, NM_001244766	0,0441
40	MRPL54		NM_172251	0,0910
	MYOF	Hs.602086	NM_133337, NM_013451	0,0615
	NAB2	Hs.159223	NM_005967	0,0373
	NCDN	Hs.121870	NM_001014841, NM_001014839, NM_014284	0,0876
	NCKAP1	Hs.603732	NM_013436, NM_205842	0,0299
	NCR3		NM_147130, NM_001145466, NM_001145467	0,0595
45	NDUFA12	Hs.674965	NM_018838, NM_001258338	0,0936
	NEDD4L	Hs.185677	NM_001243960, NM_001144967, NM_015277, NM_001144971, NM_001144968, NM_001144969, NM_001144970, NM_001144966, NM_001144964, NM_001144965	0,0333
	NEURL3	Hs.149219	NM_001285485, NM_001285486	0,0821
	NINL	Hs.631508	NM_025176	0,0709

RU 2 743 657 C2

	NOSIP	Hs.7236	NM_001270960, NM_015953	0,0001
	NRP2	Hs.471200	NM_201266, NM_201264, NM_201267, NM_003872, NM_018534, NM_201279	0,0926
	OSMR	Hs.120658	NM_001168355, NM_003999	0,0432
	PANX2	Hs.440092	NM_001160300, NM_052839	0,0376
5	PCBP3	Hs.736936	NM_020528, NM_001130141	0,0089
	PHKA1	Hs.201379	NM_002637, NM_001122670, NM_001172436	0,0130
	PITPNC1	Hs.591185	NM_181671, NM_012417	0,0373
	PLXNB2	Hs.3989	NM_012401	0,0148
	PLXNB3	Hs.632833	NM_005393, NM_001163257	0,0981
	PMCH		NM_002674	0,0383
10	POU2AF1	Hs.654525, Hs.733573, Hs.739353	NM_006235	0,0376
	PPARG	Hs.162646	NM_138712, NM_005037, NM_138711, NM_015869	0,0821
	PPCDC	Hs.458922, Hs.640486	NM_021823, NM_001301103, NM_001301101, NM_001301102, NM_001301104, NM_001301105	0,0224
	PRDM1	Hs.436023	NM_001198, NM_182907	0,0376
15	PRKCDBP		NM_145040	0,0615
	PRR5		NM_015366, NM_001198721, NM_181333, NM_001017528, NM_001017530, NM_001017529	0,0384
	PSEN2	Hs.25363	NM_000447, NM_012486	0,0299
	PTPN6	Hs.63489	NM_080548, NM_002831, NM_080549	0,0733
	PTPRCAP		NM_005608	0,0521
20	PTPRD	Hs.446083	NM_002839, NM_130391, NM_001171025, NM_130393, NM_001040712, NM_130392	0,0141
	PVR		NM_006505, NM_001135769, NM_001135768, NM_001135770	0,0149
	RABL3	Hs.444360	NM_173825	0,0733
	RBMY1E		NM_001006118	0,0089
25	RGL1	Hs.497148	NM_001297669, NM_015149, NM_001297670, NM_001297671, NM_001297672	0,0891
	RNASE4		NM_001282193, NM_001282192, NM_002937, NM_194431	0,0860
	RORC	Hs.256022	NM_001001523, NM_005060	0,0027
	RPS28		NM_001031	0,0763
	S100A4		NM_019554, NM_002961	0,0047
	SCARBI		NM_001082959, NM_005505	0,0327
30	SCD	Hs.558396	NM_005063	0,0870
	SCML4		NM_001286408, NM_001286409, NM_198081	0,0860
	SDC1	Hs.224607	NM_002997, NM_001006946	0,0299
	SDK2	Hs.435719	NM_001144952	0,0981
	SEPT3	Hs.120483	NM_145733, NM_019106	0,0582
	SEPT5-GP1BB			0,0107
35	SGPP2	Hs.591604	NM_152386	0,0347
	SH2B2	Hs.489448	NM_020979	0,0373
	SH3TC1	Hs.479116, Hs.630085	NM_018986	0,0205
	SKAP1	Hs.316931	NM_003726, NM_001075099	0,0661
	SLC13A3	Hs.655498	NM_022829, NM_001193340, NM_001193339, NM_001193342, NM_001011554	0,0254
40	SLC22A17	Hs.373498	NM_001289050, NM_016609, NM_020372	0,0944
	SLC27A2	Hs.11729	NM_003645, NM_001159629	0,0811
	SLC29A1	Hs.25450	NM_001304463, NM_001078175, NM_001078177, NM_001304465, NM_001304466, NM_001304462	0,0150
	SLC41A2		NM_032148	0,0936
	SLC43A3	Hs.99962	NM_014096, NM_001278201, NM_199329, NM_017611, NM_001278206	0,0423
45	SLC4A10	Hs.333958	NM_022058, NM_001178015, NM_001178016	0,0376
	SOAT2	Hs.656544	NM_003578	0,0130
	SORCS3	Hs.671950	NM_014978	0,0876
	SPIRE 1	Hs.515283	NM_001128626, NM_020148, NM_001128627	0,0615
	SPNS3		NM_182538	0,0001
	SPOCK1	Hs.582184, Hs.596136	NM_004598	0,0718

	SRCIN1	Hs.448872	NM_025248	0,0661
	SSBP3	Hs.733025	NM_145716, NM_001009955, NM_018070	0,0376
	STX8		NM_004853	0,0937
	SULT2B1	Hs.369331	NM_177973, NM_004605	0,0150
5	TERT	Hs.492203	NM_198253, NM_001193376, NM_005424	0,0765
	TIE1	Hs.78824	NM_005424, NM_001253357	0,0931
	TLE4		NM_007005, NM_001282760, NM_001282748, NM_001282749, NM_001282753	0,0891
	TMOD1	Hs.404289	NM_003275, NM_001166116	0,0308
	TNFRSF19		NM_148957, NM_018647, NM_001204458, NM_001204459	0,0224
10	TNFRSF4	Hs.129780	NM_003327	0,0884
	TOB1	Hs.744946	NM_005749, NM_001243885, NM_001243877	0,0945
	TOX2	Hs.26608	NM_001098797, NM_001098796, NM_032883, NM_001098798	0,0347
	TRIB2	Hs.467751	NM_021643	0,0666
	TSKU	Hs.8361	NM_015516, NM_001258210	0,0027
	TSPAN13		NM_014399	0,0376
	TTBK1	Hs.485436	NM_032538	0,0027
15	TTC39C	Hs.733420	NM_153211, NM_001243425, NM_001135993, NM_001292030	0,0172
	TUBB6	Hs.193491, Hs.744066	NM_001303524, NM_032525, NM_001303529, NM_001303526, NM_001303525	0,0271
	uc001acl			0,0212
	uc004aex			0,0299
	uc010eif			0,0243
20	uc021oxp			0,0595
	USP44		NM_032147, NM_001042403, NM_001278393	0,0666
	XYLT1	Hs.22907	NM_022166	0,0890
	ZBTB20		NM_001164343, NM_001164347, NM_001164345, NM_001164342, NM_015642, NM_001164344, NM_001164346	0,0148
	ZBTB32	Hs.99430, Hs.736841	NM_014383	0,0384
25	ZNF219	Hs.250493	NM_016423, NM_001102454, NM_001101672	0,0860
	ZNF683	Hs.353208	NM_001114759, NM_173574, NM_001307925	0,0205

Проводили анализ набора генов для прогнозирования ответа пациента на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, CTL019). Анализ набора генов проводили для наборов генов, описанных в примере 1, и для наборов генов из трех дополнительных наборов данных, описанных в примере 2 (Szabo et al., Abbas et al. и Gattinoni et al.). Каждый набор генов оценивали для определения его ассоциации с ответом индивидуума (т.е. CR, PR или NR), как описано в примере 2. Наборы генов, для которых было показано, что они изменены на значимом уровне и прогнозируют ответ пациента на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, CTL019) приведены в таблице 19.

Таблица 19. Наборы генов, прогнозирующих ответ пациента на терапию CAR

Набор генов	Источник	CR	NR
T <sub>REG</sub> против T <sub>EFF</sub> , 0 ч	Szabo	T <sub>EFF</sub> , 0 ч	T <sub>REG</sub> , 0 ч
T <sub>REG</sub> против T <sub>EFF</sub> , 16 ч	Szabo	T <sub>EFF</sub> , 16 ч	T <sub>REG</sub> , 16 ч
T <sub>EFF</sub> , 16 ч против 0 ч	Szabo	T <sub>EFF</sub> , 0 ч	T <sub>EFF</sub> , 16 ч
T <sub>REG</sub> 16 ч против 0 ч	Szabo	T <sub>REG</sub> , 0 ч	T <sub>REG</sub> , 16 ч
Наивные CD4 против активированных Th2 через 12 ч	Abbas	Наивные CD4	Th2
Наивные CD4 против активированных Th2 через 48 ч	Abbas	Наивные CD4	Th2
Наивные CD4 против активированных Th1 через 12 ч	Abbas	Наивные CD4	Th1
Нестимулированные против стимулированных клеток памяти	Abbas	Нестимулированные	Стимулированные
Прогрессирующее подавление	Gattinoni	Ранняя стадия	Поздняя стадия

Значимые наборы генов из анализов, приведенных выше, уточняли до подгруппы генов в наборах генов, которые на статистически значимом уровне дифференциально экспрессировались между CR и NR. Иллюстративный перечень генов, которые на статистически значимом уровне дифференциально экспрессировались, приведен в таблице 20. В таблице 20 приведен иллюстративный перечень биомаркеров, уровни экспрессии которых прогнозируют ответ пациента на терапию CTL019. Таблица 20 может быть далее уточнена до меньшего перечня биомаркеров с высокой достоверностью путем выбора более строгого FDR. Например, использование FDR 0,10 приведет к перечню из 265 генов и FDR 0,01 приведет к перечню из 27 генов.

Таблица 20. Иллюстративные биомаркеры для прогнозирования ответа пациента на терапию CAR

Ген	Unigene	Номер доступа	FDR
ABCB1	Hs.489033	NM_000927	0,0147
ABTB1	Hs.107812	NM_172027, NM_032548	0,156
ACACA		NM_198834, NM_198837, NM_198836, NM_198839, NM_198838	0,226
ACSL1	Hs.406678	NM_001995, NM_001286711, NM_001286708, NM_001286710, NM_001286712	0,0211
ACSS2	Hs.517034	NM_001242393, NM_018677, NM_001076552	0,189
ACTN1	Hs.509765	NM_001102, NM_001130004, NM_001130005	0,137
ADAM12		NM_003474, NM_001288973, NM_021641, NM_001288974, NM_001288975	0,00259
ADAM7	Hs.116147	NM_003817	0,249
ADD3		NM_019903, NM_016824, NM_001121	0,243
ADH7	Hs.389	NM_001166504, NM_000673	0,179
AES	Hs.515053	NM_198969, NM_001130, NM_198970	0,0307
AGRN	Hs.273330	NM_198576, NM_001305275	0,00795
AHCYL1	Hs.743973	NM_006621, NM_001242675, NM_001242676, NM_001242673, NM_001242674	0,24
AHI1		NM_001134830, NM_017651, NM_001134831, NM_001134832	0,106
AIM2		NM_004833	0,224
AK5	Hs.559718	NM_174858, NM_012093	0,21
AKR1C3		NM_003739, NM_001253908	0,212
ALDH18A1	Hs.500645	NM_002860, NM_001017423	0,234
ALG5		NM_013338, NM_001142364	0,171
ALOX5AP		NM_001629, NM_001204406	0,0878
ALPP	Hs.284255	NM_001632	0,218
ANAPC13	Hs.106909	NM_001242374, NM_015391, NM_001242375	0,246
ANKRD10		NM_017664, NM_001286721	0,229
ANKRD6		NM_001242813, NM_001242809, NM_014942, NM_001242811, NM_001242814	0,0842
ANXA2P3			0,219
APIG2	Hs.343244, Hs.740123	NM_001282475, NM_001282474, NM_003917	0,0756
APOA2		NM_001643	0,0265
APOBEC3C		NM_014508	0,11
APP	Hs.434980	NM_000484, NM_001136129, NM_201414, NM_001204303, NM_201413, NM_001204302, NM_001136016, NM_001136130, NM_001204301, NM_001136131	0,129
AQP3	Hs.234642	NM_004925	0,0645
ARFRP1	Hs.389277, Hs.661969	NM_001267549, NM_001134758, NM_001267544, NM_001267546, NM_001267545, NM_001267547, NM_003224, NM_001267548	0,112
ARHGEF18	Hs.465761	NM_015318, NM_001130955	0,207
ARID5A		NM_212481	0,184
ARL4C	Hs.111554, Hs.730678	NM_001282431, NM_005737	0,091



	ARNTL2		NM_001248003, NM_001248005, NM_001248002, NM_001248004, NM_020183	0,0709
	ARRDC2	Hs.515249	NM_001025604, NM_001286826, NM_015683	0,248
	ATF7IP2	Hs.513343, Hs.742019	NM_024997, NM_001256160	0,0661
5	ATP6V1B2	Hs.295917	NM_001693	0,171
	ATP8A2		NM_016529	0,222
	AURKAIP1		NM_017900, NM_001127230, NM_001127229	0,207
	AUTS2	Hs.21631	NM_001127231, NM_015570, NM_001127232	0,158
	B4GAFT7	Hs.455109	NM_007255	0,115
	BACH2	Hs.269764	NM_021813, NM_001170794	0,115
10	BANP	Hs.461705, Hs.690969	NM_001173541, NM_079837, NM_001173540, NM_017869, NM_001173543, NM_001173539, NM_001173542	0,236
	BARD1		NM_000465, NM_001282549, NM_001282543, NM_001282548, NM_001282545	0,232
	BASPI	Hs.201641	NM_006317, NM_001271606	0,137
	BCF11B	Hs.709690	NM_001282237, NM_138576, NM_001282238, NM_022898	0,134
15	BCOR		NM_017745, NM_001123384, NM_001123385, NM_001123383	0,22
	BEX4	Hs.184736	NM_001080425, NM_001127688	0,218
	BFSP1	Hs.129702	NM_001195, NM_001161705, NM_001278607, NM_001278606, NM_001278608	0,186
	BHFHE40		NM_003670	0,224
20	BIN1	Hs.193163	NM_139344, NM_139348, NM_139351, NM_139346, NM_139347, NM_139349, NM_139345, NMJXM305, NM_139343, NM_139350	0,192
	BIN2	Hs.14770	NM_001290008, NM_001290009, NM_016293, NM_001290007	0,094
	BIRC3		NM_182962, NM_001165	0,127
	BUB1	Hs.469649	NM_001278617, NM_004336, NM_001278616	0,141
25	C11orfC1	Hs.559181	NM_001142946	0,0679
	C11orf48			0,103
	C11orf67			0,227
	C11orf82			0,196
	C14orf49			0,217
	C16orf45	Hs.738182	NM_033201, NM_001142469	0,181
30	C16orf74		NM_206967	0,197
	C17orf53	Hs.437059	NM_024032, NM_001171251	0,185
	C17orf66			0,229
	C1orf162	Hs.288010	NM_174896, NM_001300834	0,135
	C1orf54		NM_001301040, NM_001301039, NM_024579, NM_001301042	0,212
35	C20orf111			0,0568
	C20orf112			0,102
	C2orf28			0,24
	C2orf89			0,159
	C5orf30	Hs.482976	NM_033211	0,207
	C5orf39			0,00226
40	C7orf10			0,162
	C7orf59			0,0455
	C9orf23			0,0943
	CA6		NM_001215, NM_001270500, NM_001270501	0,0798
	CAMK1		NM_003656	0,215
45	CAMK2G		NM_001222, NM_172173, NM_172169, NM_172170, NM_001204492, NM_172171	0,0175
	CAMK4		NM_001744	0,0524
	CAPG	Hs.687978	NM_001747, NM_001256140, NM_001256139	0,0735
	CAPS		NM_080590, NM_004058	0,0524
	CARM1		NM_199141	0,162

	CBLB	Hs.430589	NM_170662	0,061
	CCDC47	Hs.202011	NM_020198	0,104
	CCDC56			0,0674
	CCL20	Hs.75498	NM_001130046, NM_004591	0,249
5	CCL4L1			0,0434
	CCL5		NM_002985, NM_001278736	0,015
	CCNB1	Hs.23960	NM_031966	0,195
	CCND3		NM_001760, NM_001287427, NM_001136126, NM_001136017, NM_001136125, NM_001287434	0,0618
	CCR6		NM_031409, NM_004367	0,0767
10	CD 109	Hs.399891	NM_133493, NM_001159588, NM_001159587	0,013
	CD200		NM_001004196, NM_005944	0,00952
	CD22	Hs.579691, Hs.716252	NM_001185099, NM_001771, NM_001185100, NM_001278417, NM_001185101	0,124
	CD244	Hs.157872	NM_016382, NM_001166663, NM_001166664	0,0605
	CD248	Hs.195727	NM_020404	0,0548
	CD3D		NM_000732, NM_001040651	0,0455
15	CD4		NM_000616	0,166
	CD5	Hs.58685	NM_014207	0,0926
	CD55		NM_000574, NM_001300903, NM_001300904, NM_001300902, NM_001114752	0,139
	CD68	Hs.647419	NM_001251, NM_001040059	0,144
	CD80	Hs.838	NM_005191	0,061
20	CDC14A	Hs.127411	NM_033312, NM_033313, NM_003672	0,149
	CDC25B	Hs.153752	NM_001287519, NM_001287520, NM_021873, NM_004358, NM_001287522, NM_021872, NM_001287518, NM_001287516, NM_001287517	0,136
	CDC42BPB	Hs.654634	NM_006035	0,0835
	CDC42EP3	Hs.369574, Hs.689535	NM_006449, NM_001270437, NM_001270438, NM_001270436	0,126
25	CDC6		NM_001254	0,201
	CDKN1A	Hs.370771	NM_000389, NM_001220778, NM_001220777, NM_078467	0,013
	CDKN2D	Hs.435051	NM_079421, NM_001800	0,218
	CDT1		NM_030928	0,195
30	CECR1	Hs.170310	NM_177405, NM_001282228, NM_001282227, NM_001282229, NM_001282226, NM_001282225	0,147
	CEMP1		NM_001048212	0,179
	CEP55	Hs.14559	NM_001127182, NM_018131	0,241
	CFH	Hs.363396	NM_000186, NM_001014975	0,158
	CFHR2		NM_005666	0,074
	CGREF1	Hs.159525	NM_001166240, NM_006569, NM_001166239	0,201
35	CHEK1	Hs.24529	NM_001114121, NM_001274, NM_001244846, NM_001114122	0,136
	CHL1	Hs.148909, Hs.731409	NM_006614, NM_001253387, NM_001253388	0,226
	CHMP7	Hs.5019	NM_152272	0,0594
	CHST11	Hs.17569	NM_001173982, NM_018413	0,149
	CHST12	Hs.744987	NM_001243794, NM_001243795, NM_018641	0,192
40	CHST2	Hs.8786	NM_004267	0,00226
	CHSY1	Hs.110488, Hs.734921	NM_014918	0,11
	CLCA2	Hs.241551	NM_006536	0,172
	CMAHP			0,0642
	CNPY3		NM_006586	0,0605
	COL18A1	Hs.517356	NM_130445, NM_030582, NM_130444	0,189
45	COL6A1	Hs.474053	NM_001848	0,201
	CORO1C	Hs.330384	NM_014325, NM_001276471, NM_001105237	0,0566
	COX4I1		NM_001861	0,222
	CRADD	Hs.591016, Hs.719191	NM_003805	0,144
	CRKL	Hs.5613	NM_005207	0,201
	CSGALNACT	Hs.613729	NM_001130518, NM_018371	0,0589

	1			
	CSNK2A1		NM_001895, NM_177559, NM_177560	0,171
	CSTB		NMJXXHOO	0,0477
	CSTF2		NM_001325, NM_001306206	0,158
5	CTDSP1	FIs.444468	NM_001206878, NM_182642, NM_021198	0,195
	CTNNA1	FIs.445981, Hs.740112	NM_001903, NM_001290310, NM_001290309, NM_001290307, NM_001290312	0,00562
	CTNNA2	Hs.167368	NM_004389, NM_001282598, NM_001164883, NM_001282597, NM_001282600, NM_001282599	0,145
	CTNNAL1		NM_001286974, NM_003798	0,124
	CTNNBIP1	Hs.463759	NM_020248, NM_001012329	0,091
10	CTNND2	Hs.314543	NM_001332, NM_001288717, NM_001288715, NM_001288716	0,226
	CTSF	Hs.11590	NM_003793	0,224
	CTSW	Hs.416848	NM_001335	0,0929
	CTTN	Hs.596164	NM_138565, NM_005231, NM_001184740	0,0642
15	CUX1	Hs.191482	NM_181500, NM_001202546, NM_001202544, NM_001202543, NM_001202545, NM_181552, NM_001913	0,137
	CXCL13	Hs.100431	NM_006419	0,192
	CYB561	Hs.355264	NM_001017917, NM_001915, NM_001017916	0,208
	CYFIP1	Hs.26704	NM_014608, NM_001033028, NM_001287810	0,192
	D4S234E			0,224
	DAB1	Hs.477370	NM_021080	0,0455
20	DAXX		NM_001141969, NM_001254717, NM_001141970, NM_001350	0,192
	DBN1		NM_004395, NM_080881	0,0127
	DENND2D		NM_024901, NM_001271833	0,0882
	DENND3	Hs.18166	NM_014957	0,223
	DEPDC7	Hs.280990	NM_001077242, NM_139160	0,00865
25	DGKD	Hs.471675	NM_152879, NM_003648	0,0524
	DGKI	Hs.737768	NM_004717	0,0596
	DHCR24	Hs.498727	NM_014762	0,0843
	DIXDC1	Hs.655626	NM_001278542, NM_001037954, NM_033425	0,224
30	DLG2	Hs.367656	NM_001364, NM_001142702, NM_001142699, NM_001142700, NM_001300983, NM_001206769	0,00226
	DMRT1	Hs.98586	NM_021951	0,0589
	DNAJB5	Hs.237506	NM_001135004, NM_012266, NM_001135005	0,0843
	DNAJC6	Hs.647643	NM_014787, NM_001256864, NM_001256865	0,219
	DNM1	Hs.522413	NM_004408, NM_001005336, NM_001288737, NM_001288738, NM_001288739	0,244
35	DOCK7	Hs.744927	NM_033407, NM_001272000, NM_001272002, NM_001271999, NM_001272001	0,061
	DONSON		NM_017613	0,0754
	DPEP2	Hs.372633	NM_022355	0,11
	DPP7		NM_013379	0,236
	DPYD	Hs.335034	NM_000110, NM_001160301	0,133
	DPYSL2	Hs.593187	NM_001197293, NM_001386, NM_001244604	0,106
40	DSN1	Hs.632268	NM_001145318, NM_001145315, NM_001145317, NM_001145316, NM_024918	0,0767
	DTL	Hs.656473	NM_016448, NM_001286229, NM_001286230	0,234
	DUSP10	Hs.497822	NM_007207	0,162
	DUSP16		NM_030640	0,238
	DUSP22		NM_020185, NM_001286555	0,0735
	DUSP4		NM_001394, NM_057158	0,00463
45	DVL2	Hs.118640	NM_004422	0,0847
	DYNLL1	Hs.5120	NM_001037494, NM_001037495, NM_003746	0,195
	EAPP	Hs.433269	NM_018453	0,246
	EBI3		NM_005755	0,00226
	EBI3			0,00226

	EED		NM_003797, NM_152991, NM_001308007	0,0798
	EEF1D		NM_001195203, NM_032378, NM_001130056, NM_001289950, NM_001960, NM_001130053, NM_001130055, NM_001130057	0,101
	EFS	Hs.24587	NM_005864, NM_032459, NM_001277174	0,0594
5	EGFL6	Hs.12844	NM_015507, NM_001167890	0,229
	EIF2C4			0,158
	ELL2	Hs.192221	NM_012081	0,0455
	EMB	Hs.561411	NM_198449	0,24
	EMP1		NM_001423	0,0144
	ENPP2	Hs.190977	NM_006209, NM_001130863, NM_001040092	0,0275
10	EPAS1	Hs.468410	NM_001430	0,00636
	EPB41L4B	Hs.591901	NM_019114, NM_018424	0,172
	EPHA4	Hs.371218	NM_001304536, NM_001304537, NM_004438	0,157
	ERGIC3		NM_015966, NM_198398	0,207
	ERI2	Hs.248437	NM_080663, NM_001142725	0,0552
	ERP29		NM_006817, NM_001034025	0,0113
15	ESPL1	Hs.153479	NM_012291	0,236
	ESR1	Hs.208124	NM_001291230, NM_001122741, NM_001291241, NM_000125, NM_001122742, NM_001122740	0,192
20	ESRRG		NM_001134285, NM_001243511, NM_001243518, NM_001438, NM_001243514, NM_001243513, NM_206595, NM_001243506, NM_001243510, NM_001243507, NM_001243512, NM_001243509, NM_001243515, NM_001243519, NM_206594	0,195
	ETV3		NM_001145312, NM_005240	0,208
	EVI5	Hs.594434	NM_005665, NM_001308248	0,0127
	FADS1	Hs.503546, Hs.739285	NM_013402	0,16
	FADS2		NM_001281501, NM_001281502, NM_004265	0,0243
	FAH		NM_000137	0,131
25	FAIM2	Hs.567424	NM_012306	0,215
	FAIM3			0,128
	FAM125B			0,0735
	FAM134B	Hs.481704	NM_019000, NM_001034850	0,0128
	FAM134C	Hs.632262	NM_178126	0,107
	FAM40B			0,00562
30	FAM46C	Hs.356216	NM_017709	0,241
	FAM65B	Hs.559459	NM_014722, NM_015864, NM_001286447, NM_001286445, NM_001286446	0,0965
	FANCI	Hs.513126	NM_018193, NM_001113378	0,133
	FAU		NM_001997	0,137
35	FDPS		NM_001135822, NM_001242824, NM_002004, NM_001135821, NM_001242825	0,0852
	FGD3	Hs.411081	NM_001083536, NM_001286993, NM_033086	0,125
	FGF21	Hs.283015	NM_019113	0,249
	FHIT	Hs.655995	NM_002012, NM_001166243	0,0505
	FKBP11		NM_001143781, NM_016594, NM_001143782	0,0128
40	FFI1	Hs.504281	NM_002017, NM_001167681, NM_001271012, NM_001271010	0,0965
	FFT1	Hs.594454	NM_002019, NM_001160030, NM_001159920, NM_001160031	0,0243
	FFT3FG		NM_001204502, NM_001459, NM_001278637, NM_001278638, NM_001204503	0,0124
	FFVCR2	Hs.509966	NM_017791, NM_001195283	0,149
	FMNF2	Hs.654630	NM_052905	0,171
45	FNBP1		NM_015033	0,142
	FOXN3		NM_001085471, NM_005197	0,207
	FOXP1		NM_032682, NM_001244816, NM_001244815, NM_001244814, NM_001244808, NM_001244812, NM_001012505, NM_001244813, NM_001244810	0,015
	FXYS5		NM_014164, NM_144779, NM_001164605	0,0852

	FXVD7		NM_022006	0,189
	G0S2		NM_015714	0,0594
	GAB 2	Hs.429434	NM_012296, NM_080491	0,0532
	GAB3	Hs.496982	NM_080612, NM_001282283, NM_001081573	0,136
5	GABARAPF1	Hs.524250	NM_031412	0,162
	GAD2		NM_001134366, NM_000818	0,129
	GARS	Hs.404321	NM_002047	0,109
	GATM	Hs.75335	NM_001482	0,124
	GBP5	Hs.513726	NM_052942, NM_001134486	0,168
	GCET2			0,243
10	GEM	Hs.654463	NM_181702, NM_005261	0,00795
	GK	Hs.1466	NM_203391, NM_001128127, NM_000167, NM_001205019	0,0432
	GLCCI1	Hs.131673	NM_138426	0,211
	GLIPR2	Hs.493819	NM_001287010, NM_001287013, NM_022343, NM_001287011, NM_001287014, NM_001287012	0,0466
15	GMNN		NM_001251990, NM_001251989, NM_015895, NM_001251991	0,215
	GNG4	Hs.159711	NM_004485, NM_001098722, NM_001098721	0,101
	ONLY		NM_006433, NM_001302758, NM_012483	0,184
	GPC1		NM_002081	0,186
	GPD1L	Hs.82432	NM_015141	0,099
	GPKOW		NM_015698	0,167
20	GPR114			0,17
	GPR56			0,00463
	GPRC5C	Hs.446438	NM_022036, NM_018653	0,158
	GPRIN3		NM_198281	0,215
	GPSM3	Hs.520046	NM_001276501, NM_022107	0,122
25	GRAMD3	Hs.363558, Hs.664026	NM_001146319, NM_023927, NM_001146322, NM_001146321, NM_001146320	0,0594
	GRAP		NM_006613	0,158
	GTF3C4		NM_012204	0,231
	GTPBP1	Hs.276925	NM_004286	0,0665
	GYG1	Hs.477892, Hs.727448	NM_004130, NM_001184720, NM_001184721	0,124
	GZMA		NM_006144	0,0211
30	GZMH		NM_001270780, NM_033423, NM_001270781	0,159
	H19	Hs.533566		0,151
	H1F0	Hs.745024	NM_005318	0,0432
	HA02	Hs.659767	NM_001005783, NM_016527	0,17
	HBS1F	Hs.378532	NM_006620, NM_001145158, NM_001145207	0,0528
	HERPUD2		NM_022373	0,236
35	HKDC1	Hs.522988	NM_025130	0,236
	HLA-DPA1	Hs.347270	NM_033554, NM_001242524, NM_001242525	0,158
	HLA-DQA2		NM_020056, NM_002122	0,179
	HLA-DQB2	Hs.731563	NM_001198858, NM_001300790	0,226
	HLA-DRB5		NM_002125	0,0645
	HMGCR	Hs.628096	NM_000859, NM_001130996	0,0466
40	HMGCS1		NM_001098272, NM_002130	0,0666
	HNRPF			0,0566
	HOXC8		NM_022658	0,142
	HPGD	Hs.596913	NM_000860, NM_001145816, NM_001256301, NM_001256306, NM_001256307, NM_001256305	0,0276
	HPS5	Hs.437599	NM_007216, NM_181507, NM_181508	0,167
45	HSD11B1		NM_005525, NM_001206741, NM_181755	0,0502
	HSD17B11	Hs.594923	NM_016245	0,156
	HSD17B12	Hs.132513	NM_016142	0,143
	HSPA1L	Hs.690634	NM_005527	0,193
	HSPD1		NM_002156, NM_199440	0,139

	ICAM1	Hs.643447	NM 000201	0,132
	ICAM2		NM_000873, NM_001099789, NM_001099788, NM_001099786, NM_001099787	0,0847
	ICAM3	Hs.654563	NM_002162	0,229
5	IER2	Hs.501629	NM_004907	0,158
	IER3		NM 003897	0,206
	IFI44		NM_006417	0,223
	IFIH1	Hs.163173	NM_022168	0,0524
	IGBP1	Hs.496267	NM_001551	0,151
	IGSF3	Hs.171057	NM_001007237, NM_001542	0,0466
10	IL17RA	Hs.48353	NM_014339, NM_001289905	0,135
	IL1A		NM_000575	0,00562
	IL1RAP	Hs.478673	NM_001167929, NM_001167928, NM_002182, NM_134470, NM_001167930, NM_001167931	0,0524
	IL1RAPF1	Hs.658912	NM_014271	0,167
	IL1RN		NM_173843, NM_173841, NM_000577, NM_173842	0,0168
	IL21		NM_021803, NM_001207006	0,167
15	IL32		NM_001012718, NM_004221, NM_001012633, NM_001012631, NM_001012635, NM_001012634, NM_001012632, NM_001012636	0,177
	IL8			0,234
	INPP4B		NM_003866, NM_001101669	0,0965
	IRF4		NM_002460, NM_001195286	0,142
20	IRF6	Hs.591415	NM_006147, NM_001206696	0,0699
	IRF8		NM_002163	0,114
	ISG20	Hs.459265	NM_001303234, NM_001303233, NM_002201, NM_001303237	0,0354
	ITGA6	Hs.133397	NM_000210, NM_001079818	0,0441
	ITGAE	Hs.513867	NM 002208	0,192
25	ITPA		NM_033453, NM_181493, NM_001267623	0,16
	ITPK1		NM_001142594, NM_001142593, NM_014216	0,12
	JUN	Hs.696684	NM_002228	0,141
	JUNB	Hs.25292	NM_002229	0,0455
	KAZAFD1	Hs.733496	NM_030929	0,214
	KCNK1		NM 002245	0,104
30	KCNK5	Hs.444448	NM_003740	0,246
	KCNQ1		NM_000218, NM_181798	0,205
	KIFC1	Hs.436912	NM_002263	0,234
	KIT	Hs.479754	NM_001093772, NM_000222	0,0466
	KLF2	Hs.744182	NM_016270	0,166
	KLF3	Hs.298658	NM_016531	0,24
35	KLF4	Hs.376206	NM 004235	0,136
	KLF7	Hs.59908	NM_003709, NM_001270943, NM_001270942, NM_001270944	0,203
	KLRB1	Hs.169824	NM_002258	0,00226
	KLRC1	Hs.512576	NM_001304448, NM_002259, NM_213657, NM_007328, NM_213658	0,0455
40	KLRD1	Hs.562457, Hs.668357	NM_002262, NM_007334, NM_001114396	0,158
	KRT72	Hs.662013	NM_001146225, NM_001146226, NM_080747	0,212
	LAIR1		NM_001289026, NM_001289027, NM_002287, NM_021706, NM_001289025, NM_001289023	0,238
	LAMB3	Hs.497636	NM_000228, NM_001127641, NM_001017402	0,0642
	LCLAT1	Hs.468048	NM_001304445, NM_001002257, NM_182551	0,234
	LIF	Hs.2250	NM_002309, NM_001257135	0,0837
45	LIMA1	Hs.525419	NM_001243775, NM_001113546, NM_016357, NM_001113547	0,0774
	LITAF	Hs.459940	NM_001136473, NM_004862, NM_001136472	0,0747
	LMCD1		NM_014583, NM_001278235, NM_001278233, NM_001278234	0,0127

	LMNA	Hs.594444	NM_001282625, NM_005572, NM_170707, NM_001282626, NM_001257374, NM_001282624, NM_170708	0,0166
	LMNB2	Hs.538286	NM_032737	0,144
	LOC282997			0,198
5	LOC728392			0,12
	LOC728855			0,0567
	LRRC16A	Hs.649550	NM_001173977, NM_017640	0,0756
	LSAMP	Hs.26409	NM_002338	0,223
	LTA	Hs.36	NM_001159740, NM_000595	0,135
	LYAR	Hs.425427	NM_017816, NM_001145725	0,0882
10	MAP2K5		NM_145160, NM_002757, NM_001206804	0,107
	MAP2K6	Hs.463978	NM_002758	0,0594
	MATK	Hs.631845	NM_139354, NM_139355, NM_002378	0,177
	MBP	Hs.551713	NM_001025081, NM_001025090, NM_001025092, NM_002385, NM_001025100, NM_001025101	0,192
	MCAM		NM_006500	0,245
15	MCM10	Hs.198363	NM_018518, NM_182751	0,232
	MCM2	Hs.477481	NM_004526	0,119
	MCM4		NM_182746, NM_005914	0,144
	MCTP2	Hs.33368	NM_001159643, NM_018349, NM_001159644	0,147
	ME3	Hs.199743	NM_001014811, NM_001161586, NM_006680	0,136
	MEST		NM_177524, NM_001253901, NM_001253902, NM_001253900, NM_002402, NM_177525	0,192
20	METTL13	Hs.494705	NM_014955, NM_001007239, NM_015935	0,207
	METTL7A	Hs.744021	NM_014033	0,0605
	MFNG	Hs.517603	NM_002405, NM_001166343	0,061
	MGAT4C	Hs.589093, Hs.739389	NM_013244	0,0544
	MICAL2	Hs.501928, Hs.735627	NM_014632, NM_001282663, NM_001282665, NM_001282666, NM_001282667, NM_001282664	0,158
25	MID1IP1	Hs.522605	NM_001098790, NM_021242, NM_001098791	0,229
	MIR155HG	Hs.697120		0,0386
	MIS18A	Hs.190518	NM_018944	0,0906
	MLEC	Hs.701392, Hs.744910	NM_001303627, NM_014730, NM_001303628	0,244
	MLH1	Hs.195364	NM_000249, NM_001258271, NM_001258274, NM_001167618, NM_001167617, NM_001167619, NM_001258273	0,159
30	MMP19		NM_002429, NM_001272101	0,165
	MPP1	Hs.496984	NM_001166460, NM_002436, NM_001166461, NM_001166462	0,212
	MRC2	Hs.7835	NM_006039	0,215
	MRPL39		NM_017446, NM_080794	0,151
35	MRPS17	Hs.44298	NM_015969	0,0524
	MT1G		NM_005950, NM_001301267	0,214
	MTHFD1	Hs.652308	NM_005956	0,0524
	MTHFD2		NM_006636	0,0924
	MTMR4	Hs.514373	NM_004687	0,171
40	MYB	Hs.606320, Hs.626299	NM_001130173, NM_001130172, NM_005375, NM_001161657, NM_001161656, NM_001161658, NM_001161659, NM_001161660	0,0528
	MYL6		NM_021019, NM_079423	0,137
	MYOIC	Hs.286226	NM_001080779, NM_001080950, NM_033375	0,128
	MYOIF	Hs.465818	NM_012335	0,0965
	MYOF	Hs.602086	NM_133337, NM_013451	0,0243
	NAB2	Hs.159223	NM_005967	0,0128
45	NCAPD2	Hs.5719	NM_014865	0,233
	NCAPD3		NM_015261	0,236
	NCAPH		NM_015341, NM_001281710, NM_001281711, NM_001281712	0,17
	NCKAP1	Hs.603732	NM_013436, NM_205842	0,0111

	NDFIP2	Hs.525093	NM_001161407, NM_019080	0,0528
	NELL2	Hs.505326	NM_001145108, NM_006159, NM_001145110, NM_001145107, NM_001145109	0,0558
	NFKBIZ	Hs.319171	NM_001005474, NM_031419	0,181
	NHSL2	Hs.397836, Hs.660859	NM_001013627	0,192
5	NINJ2		NM_016533, NM_001294345, NMJ101294346	0,061
	NKG7		NM_005601	0,123
	NKIRAS1	Hs.173202	NM_020345	0,201
	NMT2		NM_004808, NM_001308295	0,0842
	NOG	Hs.248201	NM_005450	0,171
	NOSIP	Hs.7236	NM_001270960, NM_015953	3,65E-05
10	NPC2	Hs.433222	NM_006432	0,156
	NPY		NM_000905	0,0466
	NR1D2	Hs.37288	NM_001145425, NM_005126	0,139
	NR2E1	Hs.157688	NM_003269, NM_001286102	0,0871
	NR3C2	Hs.163924	NM_000901, NM_001166104	0,0645
	NR4A3	Hs.279522	NM_173199, NM_006981, NM_173200	0,171
15	NSMCE1	Hs.284295	NM_145080	0,0711
	NUP205	Hs.743250	NM_015135	0,162
	OASL		NM_003733, NM_198213, NM_001261825	0,192
	ODC1		NM_002539, NM_001287188, NM_001287190, NM_001287189	0,139
	OLFM2		NM_058164, NM_001304348, NM_001304347	0,229
20	ORC6		NM_014321	0,0798
	OSBPL8	Hs.430849	NM_020841, NM_001003712	0,227
	OTUD7B		NM_020205	0,0487
	P2RX4		NM_002560, NM_001256796, NM_001261397, NM_001261398	0,0671
	P4HA2	Hs.519568	NM_001142598, NM_001142599, NM_001017974, NM_001017973, NM_004199	0,107
25	PACSIN3	Hs.334639	NM_016223, NM_001184974, NM_001184975	0,226
	PAICS	Hs.518774	NM_001079525, NM_001079524, NM_006452	0,167
	PAM	Hs.369430, Hs.738567	NM_001177306, NM_138822, NM_138821, NM_000919, NM_138766	0,218
	PANX2	Hs.440092	NM_001160300, NM_052839	0,0128
	PARP8	Hs.369581	NM_001178055, NM_024615, NM_001178056	0,122
30	PBX4	Hs.466257	NM_025245	0,211
	PCSK5	Hs.368542	NM_006200, NM_001190482	0,0473
	PDCD1	Hs.158297	NM_005018	0,0747
	PDE10A	Hs.348762, Hs.638546	NM_006661, NM_001130690	0,215
	PDGFRB	Hs.509067	NM_002609	0,0628
35	PECAM1	Hs.376675	NM_000442	0,0666
	PELP1	Hs.744899	NM_014389, NM_001278241	0,192
	PERI	Hs.445534	NM_002616	0,0674
	PEX16		NM_057174, NM_004813	0,0666
	PFDN5		NM_002624, NM_145897	0,135
	PFKM	Hs.75160	NM_001166686, NM_000289, NM_001166688, NM_001166687	0,0961
40	PGAP1	Hs.229988	NM_024989	0,158
	PGCP			0,186
	PHEX		NM_001282754, NM_000444	0,149
	PHF6	Hs.356501	NM_032458, NM_001015877, NM_032335	0,202
	PHLPP1	Hs.465337	NM_194449	0,0853
45	PIK3C2G	Hs.22500	NM_001288772, NM_001288774, NM_004570	0,0629
	PINK1	Hs.389171	NM_032409	0,24
	PION			0,187
	PITPNC1	Hs.591185	NM_181671, NM_012417	0,00827
	PKMYT1	Hs.732385, Hs.734466	NM_182687, NM_004203, NM_001258451, NM_001258450	0,246



	PLAC8	Hs.546392	NM_016619, NM_001130716, NM_001130715	0,0653
	PLAGL2	Hs.154104	NM_002657	0,174
	PLCG2		NM_002661	0,118
	PLCL1		NM_006226	0,107
5	PLCL2	Hs.202010, Hs.741267	NM_001144382, NM_015184	0,141
	PLIN2		NM_001122	0,0747
	PLK2	Hs.398157	NM_006622, NM_001252226	0,205
	PLXNB2	Hs.3989	NM_012401	0,0064
	PLXND1	Hs.301685	NM_015103	0,229
	PMAIP1	Hs.96	NM_021127	0,0316
10	PMCH		NM_002674	0,0126
	PNLIPRP1	Hs.73923	NM_006229, NM_001303135	0,137
	PNMA1	Hs.194709	NM_006029	0,11
	POU2AF1	Hs.654525, Hs.733573	NM_006235	0,0127
	POU6F1	Hs.555886	NM_002702	0,229
15	PPCDC	Hs.458922, Hs.640486	NM_021823, NM_001301103, NM_001301101, NM_001301102, NM_001301104, NM_001301105	0,00748
	PPFIBP2	Hs.655714, Hs.739217	NM_003621, NM_001256568, NM_001256569	0,0544
	PPP1R15A	Hs.631593	NM_014330	0,0645
	PPP2R2B	Hs.739387	NM_181678, NM_181674, NM_181675, NM_181676, NM_001271899, NM_181677, NM_001271900, NM_001271948	0,061
	PPP2R3C	Hs.530712	NM_017917, NM_001305156, NM_001305155	0,167
20	PPP2R5C	Hs.368264, Hs.679341	NM_001161726, NM_178586, NM_178587, NM_002719, NM_001161725	0,158
	PPP3CA	Hs.435512	NM_000944, NM_001130692, NM_001130691	0,0679
	PQBP1		NM_001167990, NM_005710, NM_001032384, NM_144495, NM_001032381, NM_001167989, NM_001032382, NM_001032383	0,141
25	PRC1	Hs.366401	NM_003981, NM_199413, NM_001267580	0,0642
	PRDM1	Hs.436023	NM_001198, NM_182907	0,0127
	PRF1	Hs.2200	NM_001083116, NM_005041	0,192
	PRKAR1B	Hs.520851	NM_001164761, NM_001164758, NM_002735, NM_001164760, NM_001164759, NM_001164762	0,167
	PRKCDBP		NM_145040	0,0181
	PRKCH	Hs.333907, Hs.630857	NM_006255	0,0889
30	PRKCQ	Hs.498570	NM_006257, NM_001282644, NM_001242413, NM 001282645	0,115
	PRKD3	Hs.660757	NM_005813	0,195
	PRKG2	Hs.570833	NM_001282485, NM_006259, NM_001282483, NM_001282482, NM_001282481, NM_001282480	0,205
	PRNP	Hs.472010	NM_001080121, NM_001271561, NM_001080122, NM_000311, NM_183079, NM_001080123	0,236
35	PRR5		NM_015366, NM_001198721, NM_181333, NM_001017528, NM_001017530, NM_001017529	0,0135
	PRSS23	Hs.25338, Hs.729257	NM_001293180, NM_001293178, NM_007173, NM_001293179	0,158
	PSMA5	Hs.485246	NM_002790, NM_001199773, NM_001199774, NM_001199772	0,213
40	PSMB9		NM_002800	0,234
	PSMC2	Hs.437366	NM_001204453, NM_002803	0,246
	PSMD11		NM_001270482, NM_002815	0,206
	PSMD14	Hs.740477	NM_005805	0,131
	PTGFRN	Hs.418093	NM_020440	0,215
	PTPN12	Hs.61812	NM_002835, NM_001131008, NM_001131009	0,205
45	PTPN14	Hs.193557, Hs.688910	NM_005401	0,124
	PTPN3	Hs.436429, Hs.698275	NM_001145368, NM_002829, NM_001145369, NM_001145370	0,135
	PTPN4	Hs.469809	NM_002830	0,187
	PTPN6	Hs.63489	NM_080548, NM_002831, NM_080549	0,0174
	PTTG1		NM_004219, NM_001282383, NM_001282382	0,235

	PUS7	Hs.520619	NM_019042	0,127
	PVR		NM_006505, NM_001135769, NM_001135768, NM_001135770	0,0064
	PYCARD		NM_013258, NM_145182	0,0843
5	PYCR1		NM_006907, NM_153824, NM_001282279, NM_001282281, NM_001282280	0,235
	RAB37		NM_175738, NM_001163989, NM_001006638, NM_001163990	0,192
	RACGAP1	Hs.505469	NM_013277, NM_001126104, NM_001126103	0,167
	RAD51		NM_001164270, NM_002875, NM_133487, NM_001164269	0,246
10	RAP1GAP2	Hs.499659, Hs.685132	NM_015085, NM_001100398	0,167
	RARRES3		NM_004585	0,116
	RASAL1	Hs.528693	NM_001193520, NMJXM658, NM_001193521, NM_001301202	0,125
	RASGEF1A	Hs.125293	NM_001282862, NM_145313	0,0831
	RASGRP2	Hs.99491	NM_001098671, NM_001098670, NM_153819	0,115
15	RASGRP4	Hs.130434	NM_001146202, NM_001146204, NM_001146205, NM_170604, NM_001146207, NM_001146203, NM_001146206	0,129
	RBMS1	Hs.470412, Hs.654231	NM_016836, NM_002897	0,0466
	REEP2		NM_001271803, NM_016606	0,135
	REPIN1	Hs.647086	NM_001099695, NM_014374, NM_013400, NM_001099696	0,243
20	RGS1	Hs.75256	NM_002922	0,149
	RGS12		NM_198229, NM_002926, NM_198227	0,192
	RGS9	Hs.664380	NM_001165933, NM_001081955, NM_003835	0,222
	RHOB	Hs.502876	NM_004040	0,0842
	RNF125	Hs.633703	NM_017831	0,135
	RNF19A	Hs.292882, Hs.735657	NM_015435, NM_183419, NM_001280539	0,0544
25	RPLP2		NM_001004	0,111
	RPS20		NM_001146227, NM_001023	0,189
	RPS27		NM_001030	0,0505
	RPS28		NM_001031	0,0135
	RPS6KA3	Hs.445387	NM_004586	0,189
	RSAD2	Hs.17518	NM_080657	0,229
30	RTF1	Hs.511096	NM_015138	0,219
	RYBP		NM_012234	0,156
	S100A4		NM_019554, NM_002961	0,00133
	S1PR1	Hs.154210	NM_001400	0,151
	S1PR4	Hs.662006, Hs.688059	NM_003775	0,0505
	SALL2	Hs.416358, Hs.745364	NM_005407, NM_001291446, NM_001291447	0,0685
35	SCD	Hs.558396	NM_005063	0,0265
	SCGB1A1		NM_003357	0,152
	SCML4		NM_001286408, NM_001286409, NM_198081	0,0243
	SDC4	Hs.632267	NM_002999	0,156
	SDK2	Hs.435719	NM_001144952	0,0307
	SECTM1	Hs.558009	NM_003004	0,0735
40	SELPLG		NM_003006, NM_001206609	0,245
	SEMA3B	Hs.82222	NM_001290060, NM_001005914, NM_001290061, NM_001290063, NM_001290062, NM_004636	0,0477
	SEPT3	Hs.120483	NM_145733, NM_019106	0,0175
	SERPINF1		NM_002615	0,11
	SERPINF2	Hs.159509	NM_001165921, NM_001165920, NM_000934	0,21
45	SFMBT2	Hs.407983	NM_001018039, NM_001029880	0,0871
	SFXN1		NM_022754	0,174
	SGCB	Hs.438953	NM_000232	0,12
	SGTB	Hs.482301	NM_019072	0,246
	SH2B2	Hs.489448	NM_020979	0,0127

	SHF	Hs.310399	NM_001301169, NM_001301168, NM_138356, NM_001301170, NM_001301171	0,0567
	SIGIRR	Hs.501624	NM_001135054, NM_021805, NM_001135053	0,143
	SIGFEC9	Hs.245828	NM_014441, NM_001198558	0,246
5	SIPA1F1	Hs.654657	NM_001284245, NM_015556, NM_001284247, NM_001284246	0,215
	SKAP1	Hs.316931	NM_003726, NM_001075099	0,0127
	SFA2	Hs.713578	NM_032214, NM_175077	0,227
	SLAMF1		NM_003037	0,246
	SFC11A1	Hs.591607	NM_000578	0,144
10	SFC14A1		NM_001308278, NM_015865, NM_001146036, NM_001128588, NM_001308279, NM_001146037	0,243
	SFC16A1	Hs.75231	NM_003051, NM_001166496	0,18
	SFC1A4	Hs.654352	NM_001193493, NM_003038	0,246
	SFC1A5	Hs.631582	NM_005628, NM_001145145, NM_001145144	0,218
	SFC22A17	Hs.373498	NM_001289050, NM_016609, NM_020372	0,0366
	SFC25A20	Hs.13845	NM_000387	0,22
15	SFC27A2	Hs.11729	NM_003645, NM_001159629	0,0274
	SFC29A1	Hs.25450	NM_001304463, NM_001078175, NM_001078177, NM_001304465, NM_001304466, NM_001304462	0,00562
	SFC2A1	Hs.473721	NM_006516	0,0507
	SFC2A3	Hs.419240	NM_006931	0,192
	SFC35F2	Hs.524014	NM_017515	0,0567
20	SFC39A1	Hs.7854	NM_001271958, NM_001271957, NM_014437, NM_001271959, NM_001271960, NM_001271961	0,144
	SFC39A14	Hs.491232	NM_015359, NM_001135154, NM_001128431, NM_001135153	0,156
	SFC43A1	Hs.591952	NM_003627, NM_001198810	0,192
	SFC43A3	Hs.99962	NM_014096, NM_001278201, NM_199329, NM_017611, NM_001278206	0,015
25	SLC46A3		NM_181785, NM_001135919	0,0767
	SLC03A1	Hs.311187	NM_013272, NM_001145044	0,151
	SMAP2	Hs.15200	NM_022733, NM_001198978, NM_001198980, NM_001198979	0,164
	SMTN		NM_134270, NM_006932, NM_134269, NM_001207018, NM_001207017	0,162
30	SMYD5	Hs.631882	NM_006062	0,246
	SNAI2	Hs.360174	NM_003068	0,0502
	SNTB1	Hs.46701	NM_021021	0,162
	SNTG1		NM_001287813, NM_018967, NM_001287814	0,0585
	SORD		NM_003104	0,0455
	SPATA7		NM_018418, NM_001040428	0,0965
35	SPATS2L	Hs.120323, Hs.734045	NM_001282735, NM_015535, NM_001100422, NM_001282743, NM_001100424, NM_001100423, NM_001282744	0,061
	SPINK2		NM_021114, NM_001271718, NM_001271720, NM_001271722, NM_001271721	0,0642
	SPINT1	Hs.233950	NM_003710, NM_001032367, NM_181642	0,246
	SPSB3	Hs.592080	NM_080861	0,122
40	SQLE	Hs.71465	NM_003129	0,0502
	SREK1IP1	Hs.69504	NM_173829	0,163
	SSBP3	Hs.733025	NM_145716, NM_001009955, NM_018070	0,0112
	SSH1		NM_018984, NM_001161330, NM_001161331	0,163
	SSR2		NM_003145	0,0544
45	ST6GALNAC 2	Hs.592105	NM_006456	0,224
	ST8SIA1	Hs.408614	NM_003034	0,0699
	STAMBIP	Hs.469018, Hs.732857	NM_213622, NM_006463, NM_201647	0,11
	STAP1	Hs.435579	NM_012108	0,0685
	STAT6	Hs.524518	NM_003153, NM_001178078, NM_001178081, NM_001178079, NM_001178080	0,158

	STIL	Hs.525198, Hs.673209	NM_001282936, NM_003035, NM_001048166, NM_001282937, NM_001282939, NM_001282938	0,205
	STIP1	Hs.337295, Hs.618350	NM_001282652, NM_006819, NM_001282653	0,223
	STK38	Hs.409578	NM_001305102, NM_007271	0,0924
	STMN3		NM_015894, NM_001276310	0,0735
5	STOM		NM_004099, NM_001270526, NM_198194, NM_001270527	0,112
	STX1A	Hs.647024	NM_004603, NM_001165903	0,222
	STX6	Hs.518417	NM_005819, NM_001286210	0,236
	SV2A	Hs.516153	NM_014849	0,216
	SVIL	Hs.499209	NM_003174, NM_021738	0,243
10	SYT1	Hs.310545	NM_001135805, NM_005639, NM_001291901, NM_001135806	0,0645
	SYTL1		NM_032872, NM_001193308	0,23
	SYTL2	Hs.369520	NM_206929, NM_206930, NM_001162951, NM_001162952, NM_001289610, NM_001289608, NM_032943, NM_001162953	0,0502
15	SYTL3		NM_001242395, NM_001009991, NM_001242384, NM_001242394	0,129
	TAF7	Hs.438838	NM_005642	0,0836
	TARP			0,22
	TARS		NM_001258437, NM_152295, NM_001258438	0,158
	TBCC		NM_003192	0,246
20	TBX15	Hs.146196	NM_152380	0,00865
	TCEAL4		NM_001300901, NM_024863, NM_001006935, NM_001006937	0,0594
	TCF7		NM_003202, NM_201634, NM_001134851, NM_213648, NM_201632	0,114
	TERT	Hs.492203	NM_198253, NM_001193376	0,0311
	TGFB1	Hs.645227	NM_000660	0,12
25	TGFBR3		NM_001195684, NM_001195683, NM_003243	0,188
	TIGIT	Hs.421750	NM_173799	0,234
	TJP3	Hs.25527	NM_001267560, NM_001267561	0,248
	TFE4		NM_007005, NM_001282760, NM_001282748, NM_001282749, NM_001282753	0,0302
	TMEM194A			0,106
30	TMEM212	Hs.642307	NM_001164436	0,102
	TMEM48			0,171
	TMEM5	Hs.216386	NM_014254, NM_001278237	0,178
	TMEM71	Hs.293842	NM_144649, NM_001145153	0,234
	TMEM80		NM_001042463, NM_174940, NM_001276274, NM_001276253	0,246
35	TMEM9B		NM_001286094, NM_020644, NM_001286095	0,192
	TMPRSS6	Hs.370885	NM_153609, NM_001289001, NM_001289000	0,0585
	TNFAIP1	Hs.76090	NM_021137	0,167
	TNFRSF11A		NM_001270951, NM_003839, NM_001278268, NM_001270949, NM_001270950	0,0605
	TNFRSF18	Hs.212680	NM_148901, NM_004195, NM_148902	0,0366
40	TNFRSF25	Hs.462529	NM_148967, NM_148970, NM_148966, NM_003790, NM_148965	0,163
	TNFRSF4	Hs.129780	NM_003327	0,0337
	TNFRSF8	Hs.1314	NM_001243, NM_001281430	0,106
	TNFRSF9	Hs.86447	NM_001561	0,0524
	TOX2	Hs.26608	NM_001098797, NM_001098796, NM_032883, NM_001098798	0,0107
45	TP53INP2	Hs.516994	NM_021202	0,139
	TPCN1	FIs.524763	NM_017901, NM_001143819, NM_001301214	0,181
	TPK1	FIs.660232	NM_022445, NM_001042482	0,24
	TPMT	FIs.444319	NM_000367	0,232

	TRAPPC6A		NM_024108, NM_001270893, NM_001270891, NM_001270892	0,0638
	TRIB1	Hs.444947	NM_025195, NM_001282985	0,074
	TRIB2	Hs.467751	NM_021643	0,0181
	TRIM25	Hs.528952	NM_005082	0,143
5	TRIP10	Hs.515094	NM_004240, NM_001288962, NM_001288963	0,149
	TRPM3		NM_001007471, NM_020952, NM_206946, NM_206945, NM_001007470, NM_206948, NM_024971, NM_206944, NM_206947	0,195
	TSPAN18	Hs.385634	NM_130783	0,129
	TSPAN32		NM_139022	0,0502
10	TTC21B	Hs.310672	NM_024753	0,243
	TTC39C	Hs.733420	NM_153211, NM_001243425, NM_001135993, NM 001292030	0,00494
	TTL4	Hs.471405	NM_014640	0,158
	TUBB	Hs.636480	NM_001293213, NM_178014, NM_001293215, NM_001293216, NM_001293212	0,236
	TUBB2B	Hs.300701	NM_178012	0,0386
15	TUBB6	Hs.193491, Hs.744066	NM_001303524, NM_032525, NM_001303529, NM_001303526, NM_001303525	0,00952
	UBA52	Hs.5308	NM_003333, NM_001033930	0,0902
	UBASH3B	Hs.444075	NM_032873	0,0666
	UBL3	Hs.145575	NM_007106	0,0929
	UHRF1BP1L	Hs.620701	NM_015054, NM_001006947	0,0666
20	UNC119	Hs.410455	NM_005148, NM_054035	0,168
	URGCP	Hs.663312	NM_017920, NM_001077664, NM_001290075, NM_001290076, NM_001077663	0,141
	USP22	Hs.462492	NM_015276	0,0745
	USP25		NM_013396, NM_001283042, NM_001283041	0,232
	USP51	Hs.40061	NM_201286	0,186
25	UXS1	Hs.730756	NM_001253875, NM_025076, NM_001253876	0,167
	UXT		NM_004182, NM_153477	0,0826
	VDAC3		NM_001135694, NM_005662	0,158
	VDR	Hs.524368	NM_001017535, NM_001017536, NM_000376	0,124
	VIPR1	Hs.348500, Hs.683175	NM_001251882, NM_001251885, NM_004624, NM_001251883, NM_001251884	0,0642
30	VNN2	Hs.293130, Hs.740120	NM_004665, NM_078488, NM_001242350	0,129
	VSIG1	Hs.177164	NM_182607, NM_001170553	0,0709
	WASF2	Hs.469244	NM_006990, NM_001201404	0,137
	WEE1		NM_003390, NM_001143976	0,0594
	WIPI1	Hs.463964	NM_017983	0,171
	WNT10A	Hs.121540	NM_025216	0,0502
35	XYLT1	Hs.22907	NM_022166	0,0278
	YPEL1		NM_013313	0,195
	YWHAG	Hs.744840	NM_012479	0,0783
	ZBP1	Hs.302123	NM_001160417, NM_030776, NM_001160418, NM_001160419	0,218
40	ZBTB20		NM_001164343, NM_001164347, NM_001164345, NM_001164342, NM_015642, NM_001164344, NM_001164346	0,00562
	ZBTB32	Hs.99430, Hs.736841	NM_014383	0,0128
	ZC3H12A	Hs.656294	NM_025079	0,198
	ZC3H12C	Hs.376289	NM_033390	0,0628
	ZC3H12D		NM_207360	0,0709
	ZEB2	Hs.34871	NM_014795, NM_001171653	0,0594
45	ZFP161			0,0965
	ZFP36L2	Hs.503093	NM_006887	0,218
	ZHX2	Hs.377090	NM_014943	0,144
	ZNF267		NM_003414	0,127
	ZNF282	Hs.729056	NM_003575, NM_001303481	0,121

ZNF506		NM_001099269, NM_001145404	0,195
ZNF587	Hs.744891	NM_032828, NM_001204817	0,236
ZNF652		NM_014897, NM_001145365	0,0429
ZNF688		NM_145271, NM_001024683	0,229
ZNF704	Hs.434957, Hs.730558	NM_001033723	0,215
ZNRF1	Hs.427284	NM_032268	0,164

### Пример 3: Прогностические проточно-цитометрические анализы

Прогностические проточно-цитометрические анализы были разработаны для скрининга индивидуумов со злокачественной опухолью (например, пациентов с гематологической злокачественной опухолью, такой как ALL и CLL) в отношении терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), например, терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, как описано в настоящем описании, например, такой как терапия CTL019. В некоторых вариантах осуществления индивидуумы участвуют в клинических испытаниях.

Образец (например, образец крови) выделяют от пациента и проводят флуоресцентный проточно-цитометрический анализ для скрининга одного или нескольких биомаркеров клеточной поверхности или секретируемых биомаркеров, описанных в примерах 1 и 2. Иллюстративный перечень маркеров, которые количественно определяют, например, посредством проточной цитометрии, если они экспрессируются на поверхности, или посредством ELISA, если они секретируются, и уровни экспрессии которых прогнозируют ответ пациента на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками), например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19, как описано в настоящем описании, например, такую как терапия CTL019, включает, но не ограничивается ими, гены, приведенные в таблице 8.

Таблица 8: Иллюстративные количественно определенные маркеры, которые прогнозируют ответ пациента на терапию CAR-экспрессирующими клетками

Ген	Unigene	Номер доступа
ATP1B3	Hs.477789	NM_001679
CCL17	Hs.546294	NM_002987
CCL3	Hs.514107	NM_002983
CCL4	Hs.75703	NM_002984
CCR1	Hs.301921	NM_001295
CD40LG	Hs.592244	NM_000074
CD58	Hs.34341	NM_001144822, NM_001779
CD70	Hs.715224, Hs.501497	NM_001252
CD80	Hs.838	NM_005191
CSF1	Hs.591402	NM_000757, NM_172212, NM_172211, NM_172210
FCER2	Hs.465778	NM_002002
GPR56	Hs.513633	NM_001145773, NM_001145774, NM_001145771, NM_001145772, NM_005682, NM_201525, NM_001145770
HAVCR1	Hs.129711	NM_001099414, NM_012206
HLA-DMA	Hs.351279	NM_006120
HLA-DPA1	Hs.347270	NM_033554
HLA-DRA	Hs.520048	NM_019111
HLA-DRB1	Hs.716081, Hs.696211, Hs.723344, Hs.534322	NM_002124, NM_021983, XM_002346251
HLA-DRB5	Hs.534322	NM_002125
ICAM3	Hs.654563	NM_002162
IFNAR2	Hs.708195	NM_207584, NM_207585, NM_000874
IFNG	Hs.856	NM_207585
IGF1R	Hs.643120, Hs.714012	NM_000875
IL10	Hs.193717	NM_000572

	IL13	Hs.845	NM_002188
	IL15RA	Hs.524117	NM_002189, NM_172200
	IL21	Hs.567559	NM_021803
	IL2RA	Hs.231367	NM_000417
5	IL2RB	Hs.474787	NM_000878
	IL3	Hs.694	NM_000588
	IL4	Hs.73917	NM_000589, NM_172348
	IL5	Hs.2247	NM_000879
	IL6ST	Hs.532082	NM_002184, NM_175767
	IL9	Hs.960	NM_000590
10	ITGA6	Hs.133397	NM_000210, NM_001079818
	KIT	Hs.479754	NM_000222, NM_001093772
	LAIR1	Hs.572535	NM_001289023, NM_001289025, NM_001289026, NM_001289027, NM_002287, NM_021706
	NFATC1	Hs.534074, Hs.701518	NM_001278669, NM_001278670, NM_001278672, NM_001278673, NM_001278675, NM_006162, NM_172387, NM_172388, NM_172389, NM_172390
15	SEFF	Hs.728756	NM_000655
	SEEP	Hs.73800	NM_003005
	SIRPG	Hs.590883	NM_001039508, NM_018556, NM_080816
	STAT6	Hs.524518	NM_001178078, NM_001178079, NM_001178080, NM_001178081, NM_003153
	TFRC	Hs.529618	NM_001128148, NM_003234
20	TIMD4	Hs.334907	NM_001146726, NM_138379
	TNFRSF1B	Hs.256278	NM_001066
	TNFRSF9	Hs.86447, Hs.738942	NM_001561

#### Пример 4: Классификаторы для прогнозирования принадлежности к классу

Исходя из понимания биологии, комбинации генов, полученные посредством несмещенной селекции генов, наборов генов и выбранных представляющих интерес генов, используют для дальнейшего отличия полностью отвечающих индивидуумов от частично отвечающих и не отвечающих индивидуумов. В одном варианте осуществления комбинации генов, полученные посредством несмещенной селекции генов, наборов генов и выбранных представляющих интерес генов, используют для дальнейшего отличия индивидуумов с рецидивом от индивидуумов без рецидива. В одном варианте осуществления классификаторы строят на основе всех генов для прогнозирования принадлежности к классу. В одном варианте осуществления прогнозирование принадлежности к классу далее различает NR, PR и CR. В одном варианте осуществления прогнозирование принадлежности к классу далее отличает пациентов с рецидивами от пациентов без рецидивов. Альтернативно или дополнительно, проводят построение классификатора, который использует подгруппу заданных значимых признаков. Значимые признаки включают, но не ограничиваются ими, перепредставленные метагены, подгруппу на значимом уровне дифференциально экспрессируемых генов в метагенах и их комбинации.

#### Пример 5: Сигнатуры экспрессии цитокинов, прогнозирующие эффективность клеток, экспрессирующих CAR

В настоящем примере описана идентификация иллюстративных сигнатур экспрессии цитокинов, которая прогнозирует ответ пациента на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками), например, терапию CTL019) при хроническом лимфоидном лейкозе (CLL) и остром лимфобластном лейкозе (ALL) для применения в соответствии с настоящим изобретением.

Среди прочего, в настоящем примере описаны новые сигнатуры экспрессии генов, которые прогнозируют эффективность произведенных продуктов CAR-экспрессирующих

клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) на основе профилей секретируемых цитокинов после активации *in vitro*.

В одном варианте осуществления новые сигнатуры экспрессии цитокинов, описанные в настоящем описании, прогнозируют эффективность произведенных продуктов CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) в отношении уничтожения опухолевых клеток-мишеней.

В одном варианте осуществления новые сигнатуры экспрессии цитокинов, описанные в настоящем описании, сопоставляют с ответом пациента на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками), например, терапию CAR-экспрессирующими клетками CTL019) при CLL, для улучшения продукта CAR-экспрессирующих клеток перед инфузией пациентам.

В одном варианте осуществления новые сигнатуры экспрессии цитокинов, описанные в настоящем описании, используют для оценки продуктов произведенных CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, продуктов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, например, продукта CTL019). В одном варианте осуществления новые сигнатуры экспрессии цитокинов, описанные в настоящем описании, обеспечивают конечный результат оптимизации процесса производства.

Были идентифицированы новые сигнатуры экспрессии цитокинов на основе уровней экспрессии белков цитокинов в образцах произведенного продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток) перед реинфузией, которые прогнозируют ответ пациента на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками) при хроническом лимфоидном лейкозе (CLL). Идентифицированные сигнатуры были обнаружены в исследовании экспрессии белков цитокинов образцов произведенного продукта, полученных из образцов 21 индивидуума с CLL. Образцы индивидуумов с CLL (всего 21) стратифицировали следующим образом: произведенный продукт CTL019 происходил от 6 пациентов, которые были полностью отвечающими индивидуумами (CR) на терапию CTL019, 5 пациентов, которые были частично отвечающими индивидуумами (PR) и 10 не отвечающих индивидуумов (NR). С использованием панели Luminex® из 13 цитокинов было обнаружено несколько сигнатур экспрессии цитокинов, отличающих отвечающих от не отвечающих индивидуумов, в произведенном продукте.

Эффективность произведенных продуктов CTL019 от 21 пациента с CLL оценивали в анализе уничтожения опухолевых клеток. В кратком изложении произведенные продукты CTL019 "активировали" *in vitro* посредством K562, экспрессировавших CD19 (клетки K562-19). Без связи с конкретной теорией, клетки K562, экспрессирующие CD19 (например, клетки K562-19), имитируют лейкозные В-клетки, экспрессирующие CD19, у пациентов с CLL. Клетки CTL019 модифицируют способами инженерии для идентификации и уничтожения клеток, которые экспрессируют антиген CD19 на их поверхности, и опосредуемое CTL019 уничтожение клеток K562-19 служит в качестве посредника для оценки эффективности опосредуемого CTL019 уничтожения опухолевых клеток.

После активации продукта CTL019 определяли профили экспрессии белков цитокинов в среде сокультуры с использованием панели цитокинов Luminex®. Профили экспрессии иллюстративных цитокинов измеряли, и эффективность продуктов клеток CTL019 сопоставляли с экспрессией различных цитокинов. Иллюстративные цитокины, рассмотренные в этом анализе, представлены в таблице 14.

Таблица 14: Иллюстративные цитокины



Цитокин	Entrez ID	Официальное обозначение гена
CCL-20/MIP-3a	6364	CCL20
GM-CSF	1437	CSF2
IFN $\gamma$	3458	IFNG
IL-10	3586	IF10
IL-13	3596	IF13
IL-17a	3605	IF17A
IL-2	3558	IF2
IL-21	59067	IF21
IL-4	3565	IF4
IL-5	3567	IF5
IL-6	3569	IF6
IL-9	3578	IF9
TNF $\alpha$	7124	TNF

Затем выявляли новые профили экспрессии цитокинов с использованием различных подходов к анализу данных, включая 1) бикластеризующий анализ; и 2) однофакторный анализ.

Данные об экспрессии цитокинов, полученные в анализе Luminex®, подвергали логарифмической нормализации и подвергали бикластеризующему анализу (иерархическую кластеризацию проводили с использованием способа полного сцепления). Бикластеризующий анализ экспрессии цитокинов в стимулированных продуктах CTL019 и у пациентов CLL выявил четыре основных кластера (пороговое расстояние <1,0, что привело к 4 кластерам, как показано на фиг.17), и были идентифицированы различные подгруппы CR/PR и NR. Иллюстративная тепловая карта бикластеризации экспрессии цитокинов в стимулированных продуктах CTL019 и у пациентов с CLL представлена на фиг.17. Неожиданно, два кластера (кластер 1 и кластер 3) практически исключительно состояли из CR и PR, в то время как другие два кластера (кластер 2 и кластер 4) включали в основном NR. В среднем, уровни экспрессии цитокинов были более высокими у CR/PR относительно NR (фиг.17).

Далее проводили однофакторный анализ 3 групп с использованием ANOVA (дисперсионный анализ), который сравнивал CR против PR против NR. Статистическую значимость определяли с использованием порогового уровня для значения  $p$  0,05. Статистическая значимость (например, значения  $p$ ) для различных цитокинов для различения CR, PR и NR приведена в таблице 15.

Таблица 15: Статистическая значимость различных цитокинов для различения CR, PR и NR в однофакторном анализе 3 групп с использованием ANOVA

Цитокин	Значение $p$
CCL20/MIP3a	0,001838
IL-17a	0,001857
IL-6	0,006017
TNF $\alpha$	0,013499
IL-2	0,034397
IL-21	0,055684
IL-5	0,075396
IL-10	0,08935
IL-9	0,098761
IFN $\gamma$	0,137263
GM-CSF	0,191839
IL-4	0,197774
IL-13	0,222134

Модель однофакторного анализа с 3 группами идентифицировала 5 цитокинов,

например, IL-17a, CCL-20/MIP3a, IL-6, IL-2 и TNF $\alpha$ , в качестве статистически значимых маркеров ответа на терапию CTL019 у пациентов с CLL (фиг.18 и таблица 15).

Иллюстративные результаты логарифмически нормализованной экспрессии статистически значимых цитокинов, которые различают пациентов CR, PR и NR, при CLL, представлены на фиг.18.

Произведенный продукт CTL019 оценивали посредством проточной цитометрии для определения процента CAR+ клеток. 5 цитокинов, идентифицированных в модели однофакторного анализа с 3 группами, далее сопоставляли с процентом CAR+ клеток в каждом из произведенных продуктов CTL019. Иллюстративные коэффициенты корреляции и соответствующие значения p для экспрессии цитокинов (полученные с помощью панели Luminex®, описанной выше) и проценты CAR+ клеток (определенных с помощью проточной цитометрии) представлены в таблице 16.

Таблица 16: Коэффициенты корреляции и соответствующие значения p для экспрессии цитокинов и процент CAR+ клеток

Цитокин	Коэффициент корреляции	Значение p
IL-17a	0,278349	0,221794
IL-10	0,390318	0,08024
CCL20/MIP3a	0,395273	0,076147
IL-5	0,494758	0,022598
IL-4	0,525982	0,014321
TNF $\alpha$	0,539276	0,011642
GM-CSF	0,588262	0,005032
IL-6	0,631841	0,002122
IFN $\gamma$	0,660738	0,001112
IL-2	0,661608	0,001089
IL-21	0,674378	0,0008
IL-9	0,70858	0,000324
IL-13	7,53E-01	8,19E-05

Процент CAR+ клеток в продукте CTL019 отражает эффективность трансдукции. При CLL процент CAR+ клеток на уровнях до сбора отличает отвечающих индивидуумов (например, полностью отвечающих индивидуумов и частично отвечающих индивидуумов) от не отвечающих индивидуумов (NR). На фиг.21 представлен иллюстративный график рассеяния, демонстрирующий процент CAR+ клеток (т.е. уровень трансдукции) до сбора для полностью отвечающих индивидуумов (CR) красным цветом, для частично отвечающих индивидуумов (PR) синим цветом и для не отвечающих индивидуумов (NR) красным цветом. Эффективность трансдукции определяли до сбора и сопоставляли с ответом индивидуума (например, CR, PR или NR). Сплошная линия соответствует эффективности трансдукции 15%, которая отличает большинство не отвечающих индивидуумов от отвечающих индивидуумов. Без связи с конкретной теорией, эти данные указывают на то, что эффективность трансдукции CAR до сбора является маркером ответа на терапию CAR-экспрессирующими клетками (например, T-клетками, NK-клетками) при CLL.

Проводили корреляционный анализ экспрессии цитокинов IL17a и CCL20, и их ассоциацию с клиническим ответом оценивали с помощью анализа графиков рассеяния. На фиг.19A представлен иллюстративный график рассеяния, демонстрирующий логарифмически нормализованную корреляцию экспрессии IL17A (ось y) и CCL20 (ось x) с коэффициентом корреляции 0,928 и соответствующим значением p 1,36e-09. Пунктирные линии соответствуют границам классификации для отделения NR от CR/PR. Каждая точка на фиг. 19A соответствует пациенту с CLL, и заштрихованная область

(NR), черная (PR) и белая (CR) области соответствуют клиническому ответу. Границы классификации на фиг.19А демонстрирует, что комбинация IL-17а и CCL20 отделяет практически всех NR от CR/PR, и PR в свою очередь кластеризуются отдельно от CR. Среди прочего, эти данные демонстрируют, что экспрессия в CAR+ клетках одного или

5 нескольких цитокинов, приведенных в таблице 16, прогнозирует клинический ответ.

Неожиданно, уровни экспрессии IL-17а и CCL-20 не коррелировали с процентом CAR+ клеток в продукте CTL019 (соответствующим эффективности трансдукции).

Без связи с конкретной теорией, эти данные указывают на то, что уровни экспрессии цитокинов IL-17а и CCL-20 являются информативными (например, прогнозирующими

10 ответ) в отношении эффективности произведенного продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), например, произведенного продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19, несколькими путями. Во-первых, сигнатуры цитокинов сопоставляют с ответом пациентов на терапию CAR-экспрессирующими

15 клетками CTL019 при CLL. Таким образом, сигнатуры цитокинов, описанные в настоящем описании, можно использовать для улучшения и/или модификации продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, продукта

клеток, экспрессирующих CAR против CD19, например, такого как CTL019) перед инфузией пациентам, для более высокой клинической эффективности. Во-вторых, сигнатуры цитокинов, описанные в настоящем описании, можно использовать для

20 оценки произведенных продуктов CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток), тем самым, обеспечивая, среди прочего, конечную точку оптимизации процесса производства.

В одном варианте осуществления сигнатуры цитокинов, описанные в настоящем описании, определяют эффективность продукта CAR-экспрессирующих клеток

25 (например, Т-клеток, НК-клеток). В одном варианте осуществления сигнатуры цитокинов, описанные в настоящем описании, являются маркерами ответа продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) при гематологической злокачественной опухоли (например, CLL или ALL).

В одном варианте осуществления сигнатуры цитокинов, описанные в настоящем описании, прогнозируют ответ индивидуума на продукт CAR-экспрессирующих клеток

30 (например, Т-клеток, НК-клеток).

В одном варианте осуществления сигнатуры цитокинов, описанные в таблице 16, прогнозируют ответ индивидуума на продукт CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток).

В одном варианте осуществления уровни экспрессии IL-17а и CCL-20 прогнозируют ответ индивидуума на продукт CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток).

**Пример 6: Идентификация факторов, которые прогнозируют рецидив у индивидуума при терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19, при В-клеточном остром лимфоцитарном лейкозе (В-ALL)**

40

В настоящем примере описана, среди прочего, идентификация новых транскрипционных сигнатур генов, которые прогнозируют рецидив у пациента на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапию CTL019) при В-клеточном остром лимфоцитарном

45 лейкозе (В-ALL) для применения в соответствии с настоящим изобретением.

Среди прочего, в настоящем примере описаны новые генные сигнатуры на основе уровней экспрессии мРНК выбранных генов у пациента до лечения клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками) (например,

CTL019) (образец, полученный посредством афереза, или костный мозг) или в образцах произведенного продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, CTL019), до реинфузии. В одном варианте осуществления в настоящем примере описаны новые генные сигнатуры, которые отличают индивидуумов с рецидивом при терапии CTL019 при В-ALL от индивидуумов без рецидива при терапии CTL019 при В-ALL.

В настоящем примере описаны способы несмещенной селекции признаков для открытия новых генных сигнатур, которые прогнозируют рецидив у индивидуума на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, CTL019) при В-ALL, для применения соответствии с настоящим изобретением.

В настоящем примере также описаны способы анализа набора генов для выявления новых генных сигнатур для применения в соответствии с настоящим изобретением.

Были идентифицированы новые генные сигнатуры на основе уровней экспрессии мРНК в образцах произведенного продукта клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток) перед реинфузией, которые прогнозируют рецидив у индивидуума при терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками) при В-клеточном остром лимфоцитарном лейкозе (В-ALL). Идентифицированные сигнатуры были выявлены в полногеномном исследовании RNAseq образцов произведенного продукта, которые включали 7 образцов от индивидуумов с В-ALL. Образцы индивидуумов с В-ALL (всего 7) стратифицировали следующим образом: биологические образцы получали от 4 индивидуумов, у которых не возникло рецидива ("индивидуум без рецидива") после терапии CTL019, и 3 индивидуумов, у которых возник рецидив ("индивидуумы с рецидивом") после терапии CTL019. Было выявлено несколько генных сигнатур, отличающих отвечающих индивидуумов от не отвечающих индивидуумов, и индивидуумов с рецидивом от индивидуумов без рецидива в произведенных образцах продукта, и они более подробно описаны ниже.

Затем были выявлены новые генные сигнатуры с использованием различных подходов анализа данных: 1) несмещенная селекция признаков; 2) анализ набора генов; и 3) дифференциальный анализ экспрессии выбранных представляющих интерес генов.

Новые генные сигнатуры, полученные в результате несмещенной селекции признаков, были выявлены посредством определения того, какие гены дифференциально экспрессировались при сравнении 2 групп между индивидуумами с рецидивом и индивидуумами без рецидива, которые сравнивали 3 индивидуумов с рецидивом с 4 индивидуумами без рецидива. Гены определяли как дифференциально экспрессируемые, если их дифференциальная экспрессия была статистически значимой при сравнении 2 групп с пороговым значением величины  $p$  FDR 0,25. Перечень генов для сравнения индивидуумов с рецидивом против индивидуумов без рецидива (N=17) приведен в таблице 17. Статистические модели для 2 групп использовали для определения того, отличался ли на статистически значимом уровне метаген между группами, аналогично подходу, проиллюстрированному на фиг.2В. На фиг.2В представлена иллюстративная тепловая карта генов, активированных в активированных T<sub>EFF</sub> против покоящихся клеток T<sub>EFF</sub> для полностью отвечающих индивидуумов (CR), частично отвечающих индивидуумов (PR) и не отвечающих индивидуумов (NR).

Без связи с конкретной теорией, эти данные указывают на то, что состояние дифференцировки Т-клеток в продукте клеток, экспрессирующих CAR против CD19 (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, CTL019), коррелирует с ответом

индивидуума (т.е. CR, PR или NR) и прогнозируют рецидив у индивидуума на терапию клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, терапию CTL019) при В-ALL. Как описано в примере 1, генные сигнатуры полностью отвечающих индивидуумов в большинстве случаев соответствуют покоемся клеткам T<sub>REG</sub> и T<sub>EFF</sub>. Среди прочего, генные сигнатуры для индивидуумов с рецидивом (например, полностью отвечающий индивидуум с рецидивом при терапии CTL019) включают гены, активированные в клетках T<sub>REG</sub> против клеток T<sub>EFF</sub> в покое. Без связи с конкретной теорией, эти данные указывают на то, что индивидуумы с рецидивом при терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, CTL019) при В-ALL имеют более высокие уровни T<sub>REG</sub> по сравнению с индивидуумами без рецидива при терапии CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, CTL019). На фиг.21 представлены иллюстративные результаты, иллюстрирующие, что T<sub>REG</sub> дифференциально увеличены в количестве у индивидуумов с рецидивом (R) против индивидуумов без рецидива, например, у индивидуумов с рецидивом экспрессируются высокие уровни генов T<sub>REG</sub> по сравнению с полностью отвечающими индивидуумами (CR) (например, индивидуумы без рецидива). Иллюстративная публикация или описание номера последовательности для последовательности каждого гена также приведены в таблице 17, и каждая публикация включена в качестве ссылки в полном объеме, включая все последовательности нуклеиновых кислот и белков в ней.

Таблица 17: Иллюстративные гены, которые прогнозируют рецидив у пациента при терапии CTL019

Ген	miRBase	Unigene	Номер доступа	FDR	Иллюстративная публикация
MIR199A1	MI0000242		NR_029586.1	2,11E-05	Landgraf et al., Cell 129 (7), 1401-1414 (2007)
PPIAL4D		Hs.730589	NM_001164261.1	3,94E-05	SEQ ID NO: 102
MIR1203	MI0006335		NR_031607.1	4,63E-03	Marton et al., Лейкоз 22 (2), 330- 338 (2008)
uc021ovp				6,73E-03	SEQ ID NO: 103
ITM2C		Hs.111577	NM_001012514.2 NM_001012516.2 NM_001287240.1 NM_001287241.1 NM_030926.5	1,17E-01	Yoshida et al., Int. J. Mol. Med. 25 (4), 649- 656 (2010)
HLA-DQB1		Hs.409934 Hs.534322	NM_001243961.1 NM_001243962.1 NM_002123.4	1,17E-01	Pankuweit et al., Gene 531 (2), 180-183 (2013)
TTY10		Hs.461175	NR_001542.1	1,25E-01	Derrien et al., Genome Res. 22 (9), 1775-1789 (2012)
TXLNG2P		Hs.522863	NR_045128.1 NR_045129.1	2,27E-01	Prakash et al., PLoS ONE 5 (10), E1 3284 (2010)
MIR4650-1	MI0017277		NR_039793.1	2,27E-01	Persson et al., Cancer Res. 71 (1), 78-86 (2011)
KDM5D		Hs.80358	NM_001146705.1 NM_001146706.1 NM_004653.4	2,27E-01	Kim et al., J. Am. Soc. Nephrol. 20 (9), 2025- 2033 (2009)
USP9Y		Hs.598540	NM_004654.3	2,27E-01	Luddi et al., N. Engl. J. Med. 360 (9), 881-885 (2009)
PRKY		Hs.584730	NR_028062.1	2,27E-01	Hogan et al., Clin Med Res 7 (3), 69-84 (2009)
RPS4Y2		Hs.367761	NM_001039567.2	2,27E-01	Ye et al., BMC Bioinformatics 13, 134 (2012)

RPS4Y1		Hs.282376	NM_001008.3	2,27E-01	Eljaafari et al., J. Immunol. 190 (1), 184-194 (2013)
NCRNA00185		Hs.138453 Hs.729534 Hs.734681	NR_001543.3 NR_125733.1 NR_125734.1 NR_125735.1 NR_125736.1 NR_125737.1	2,28E-01	Prakash et al., PLoS ONE 5 (10), E1 3284 (2010)
SULT1E1		Hs.479898	NM_005420.2	2,33E-01	Xu et al., Mol. Cell. Endocrinol. 369 (1-2), 140-149 (2013)
EIF1AY		Hs.461178	NM_001278612.1 NM_004681.3	2,38E-01	Luna et al., Biochemistry 52 (52), 9510-9518 (2013)

Анализ набора генов обеспечил ряд генных сигнатур, прогнозирующих рецидив у индивидуума при терапии CTL019 при В-ALL. Следующие гены продемонстрировали увеличенные уровни у индивидуумов с рецидивом и сниженные уровни у индивидуумов без рецидива: MIR199A1, MIR1203, uc021ovp, ITM2C и HLA-DQB1. Следующие гены продемонстрировали сниженные уровни у индивидуумов с рецидивом и увеличенные уровни у индивидуумов без рецидива: PPIAL4D, TTTY10, TXLNG2P, MIR4650-1, KDM5D, USP9Y, PRKY, RPS4Y2, RPS4Y1, NCRNA00185, SULT1E1 и EIF1AY.

В частности, в настоящем примере описаны способы анализа набора генов для выявления новых генных сигнатур для применения в соответствии с настоящим изобретением.

Среди прочего, в настоящем примере описаны новые генные сигнатуры на основе анализа набора генов, которые прогнозируют рецидив пациента при терапии клетками, экспрессирующими CAR против CD19 (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, CTL019) при В-ALL. Анализ набора генов проводили на наборах генов, описанных в таблице 17, и на наборах генов, описанных в примере 2, например, источниками наборов генов были (1) дополнительные эксперименты, основанные на наборах генов Szabo *et al.*, (описанные в настоящем описании); (2) наборы генов, опубликованные Abbas *et al.* в Genome Research 2005; и (3) наборы генов, опубликованные Gattinoni *et al.* в Nature Medicine 2011. Каждый из наборов генов Szabo, Abbas и Gattinoni подробно описан в примере 2. Наборы генов, определенные Szabo и рассматриваемые в этом анализе, приведены в таблице 2 примера 2. Наборы генов, определенные Abbas и рассматриваемые в этом анализе, приведены в таблице 3 примера 2. Наборы генов, определенные Gattinoni и рассматриваемые в этом анализе, приведены в таблице 4 примера 2.

Каждый набор генов (например, наборы генов RNAseq при В-ALL, наборы генов Szabo, наборы генов Abbas и наборы генов Gattinoni) оценивали для определения их ассоциации с ответом индивидуума (т.е. индивидуум с рецидивом или индивидуум без рецидива) следующим образом: метаген вычисляли для каждого индивидуума, где показатель метагена для индивидуума  $j$  определяли как

$$m_j = \sum_{i=1}^G \frac{x_{ij} - \mu(x_j)}{\sigma(x_j)}$$

где  $x_{ij}$  представляет собой величину экспрессии гена  $i$  у индивидуума  $j$  для данного набора генов  $n=1, \dots, G$ ;  $\mu(x_j)$  представляет собой среднее значение для генов  $1, \dots, G$  у индивидуума  $j$ ; и  $\sigma(x_j)$  представляет собой стандартное отклонение для генов  $1, \dots, G$  у индивидуума  $j$ .

Статистическую модель для 2 групп использовали для каждого набора генов для определения того, отличался ли метаген на статистически значимом уровне для произведенного продукта CTL019 у индивидуумов с рецидивом и индивидуумов без рецидива. Схематическая иллюстрация этого подхода приведена на фиг.2В. Среди наборов генов Szabo, Abbas и Gattinoni существовал один наборов генов, который на

значимом уровне дифференциально перепредставлен у индивидуумов с рецидивом относительно индивидуумов без рецидива. Этот набор генов был из коллекции Szabo и он содержит гены, активированные в клетках T<sub>REG</sub> против клеток T<sub>EFF</sub> в покое, и он коррелировал с рецидивом у пациента на терапию CTL019. В частности, было обнаружено, что этот набор генов был перепредставлен у индивидуумов с рецидивом, что указывает на то, что индивидуумы с рецидивом имеют более высокие уровни T<sub>REG</sub> по сравнению с индивидуумами без рецидива. Например, было обнаружено, что показатель метагена для набора генов, состоящего из генов, активированных в клетках T<sub>REG</sub> по сравнению с клетками T<sub>EFF</sub>, коррелирует с рецидивом у пациента в образцах продукта (см. фиг.20). На фиг.20 представлены иллюстративные результаты (p=0,000215), иллюстрирующие, что гены T<sub>REG</sub> имеют высокие уровни экспрессии у индивидуумов с рецидивом (R) по сравнению с индивидуумов без рецидива, являющихся полностью отвечающими индивидуумами (CR). На оси x представлены образцы по группе ответа, где CR=полностью отвечающий индивидуум и R=индивидуум с рецидивом. По оси y представлены нормализованные показатели экспрессии метагенов.

В одном варианте осуществления генные сигнатуры, описанные в настоящем описании, используют для обеспечения улучшения произведенного продукта, тем самым, снижая вероятность рецидива у пациента. В одном варианте осуществления генные сигнатуры, описанные в настоящем описании, используют для модификации терапевтического применения произведенного продукта, тем самым, снижая вероятность рецидива у пациента.

В одном варианте осуществления генные сигнатуры, описанные в настоящем описании, идентифицируют у индивидуума до лечения CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) (например, лечения клетками, экспрессирующими CAR против CD19, например, терапии CTL019), которые прогнозируют рецидив при лечении CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками, НК-клетками). В одном варианте осуществления генные сигнатуры, описанные в настоящем описании, идентифицируют в образце, полученном посредством афереза. В одном варианте осуществления генные сигнатуры, описанные в настоящем описании, идентифицируют в образце костного мозга. В одном варианте осуществления генные сигнатуры, описанные в настоящем описании, идентифицируют в произведенном продукте CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) (например, продукте клеток, экспрессирующих CAR против CD19, например, CTL019) перед инфузией.

Без связи с конкретной теорией, эти данные указывают на то, что снижение сигнатуры T<sub>REG</sub> у пациента до афереза или в процессе производства продукта CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток, НК-клеток) на значимом уровне снижает риск рецидива у пациента.

#### **Пример 7: Количество CD27+PD1- CART-клеток, инфузировавшихся пациенту, прогнозирует ответ на терапию**

Количество CD27+PD1- клеток в инфузируемом продукте CTL019 определяли для 29 пациентов с CLL (8 полностью отвечающих индивидуумов и 21 не отвечающий индивидуум). Взаимосвязь между количеством инфузируемых CD27+ PD1- CART-клеток и ответом на терапию представлена в качестве столбиковой диаграммы на фиг.22 и в качестве графика рассеяния на фиг.23. Пороговое значение было установлено как  $1 \times 10^7$  CART-клеток на пациента. Статистически значимое отличие (p<0,0001) наблюдали между полностью отвечающими и не отвечающими индивидуумами. Этот эксперимент показывает, что полная ремиссия у пациентов с CLL при иммунотерапии CART19

ассоциирована с более высокими количествами инфузируемых CD27+PD1- CART-клеток.

### ЭКВИВАЛЕНТЫ

Другие варианты осуществления изобретения будут очевидны специалистам в данной области с учетом описания или при применении на практике изобретения, описанного в настоящем описании. Хотя настоящее изобретение описано с помощью конкретных аспектов, очевидно, что аспекты и варианты настоящего изобретения могут быть установлены другими специалистами в данной области без отклонения от истинной сущности и объема изобретения. Прилагаемую формулу изобретения следуют истолковывать как включающую все такие аспекты и эквивалентные вариации.

10

#### (57) Формула изобретения

1. Способ оценки или мониторинга эффективности терапии CAR19-экспрессирующими клетками у индивидуума, имеющего гематологическую злокачественную опухоль, включающий:

15

получение величины уровня CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток в популяции CD8+ T-клеток в образце, полученном от индивидуума, или в образце продукта, содержащего популяцию CAR19-экспрессирующих клеток,

20

где более высокий процент CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток в CD8+ популяции по сравнению с числом CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток у не отвечающего индивидуума указывает на то, что индивидуум реагирует на терапию CAR19-экспрессирующими клетками.

25

2. Способ лечения гематологической злокачественной опухоли у индивидуума, включающий введение индивидууму продукта CAR19-экспрессирующих клеток, содержащего терапевтически эффективное количество CAR19-экспрессирующих клеток, где способ включает:

30

(a) получение величины уровня CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток в популяции CD8+ T-клеток в образце, полученном от индивидуума, где индивидуум, имеющего более высокий процент CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток в CD8+ популяции по сравнению с числом CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток у не отвечающего индивидуума, идентифицируют как полностью отвечающий индивидуум; и

(b) введение указанного продукта CAR19-экспрессирующих клеток индивидууму, идентифицированному на стадии (a) как полностью отвечающий индивидуум.

35

3. Способ по п. 1 или 2, где образец является образцом, полученным посредством афереза.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где более высокий процент CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток составляет 7% или выше.

5. Способ по любому из пп. 1-4, дополнительно включающий получение одной или более из следующих величин:

40

(i) уровень одного, двух, трех или более, например всех, из покоящихся клеток T<sub>EFF</sub>, покоящихся клеток T<sub>REG</sub>, более молодых T-клеток, например более молодых CD4 или CD8 клеток, или гамма/дельта T-клеток, или ранних T-клеток памяти или их комбинации в образце;

45

(ii) уровень одного, двух, трех или более, например всех, из активированных клеток T<sub>EFF</sub>, активированных клеток T<sub>REG</sub>, более старых T-клеток, например более старых CD4 или CD8 клеток, или поздних T-клеток памяти или их комбинации в образце;

(iii) уровень маркера истощения иммунных клеток, например, одного, двух или нескольких ингибиторов иммунной точки контроля, например PD-1, TIM-3 и/или LAG-



3, в образце;

(iv) уровень одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, двадцати или более из биомаркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, например CCL20, IL-17а и/или IL-6, таблице 16, 5 таблице 17, таблице 18, таблице 20, на фиг.2В, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1 или сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19;

(v) уровень цитокинов, например качество набора цитокинов, в образце продукта, содержащего популяцию CAR19-экспрессирующих клеток, например CTL019, где 10 цитокин выбран из одного, двух, трех, четырех, пяти, или более, или всех из цитокинов, приведенных в таблице 16;

(vi) эффективность трансдукции CAR19-экспрессирующей клетки в образце продукта, содержащего популяцию CAR19-экспрессирующих клеток;

(vii) количество CD27+ PD-1-клеток в образце, например количество, превышающее 15 или равное  $1 \times 10^7$  клеток;

(viii) уровень CD8+ Т-клеток, где указанный уровень оценивают с использованием профиля или сигнатуры, указывающей на процент CD8+ Т-клеток в образце; или

(ix) уровень одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, двадцати, пятидесяти, 20 шестидесяти, семидесяти, ста или более наборов биомаркеров или генов, приведенных в таблицах 1А, 1В, 3, 4, 5, 6, 7А, 7В или на фигуре 2В, где указанный уровень оценивают с использованием профиля или сигнатуры гена.

6. Способ по п. 5, где:

(i) биомаркер по п. 3(iv) представляет собой секретируемый биомаркер или биомаркер клеточной поверхности, приведенный в таблице 8;

(ii) уровень цитокинов по п.3(v) выбран из уровня одного, двух, трех, четырех, пяти, 25 шести, семи, восьми, или более, или всех из цитокинов CCL20/MIP3а, IL17А, IL6, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL10, IL13, IL2, IL21, IL4, IL5, IL9 или TNF $\alpha$ , или их комбинации; или

(iii) способ включает измерение уровня одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, 30 двадцати или более, например всех, биомаркеров, имеющих значение  $p$  FDR ниже 0,1 или 0,01, приведенное в таблице 1А, 1В, 17, 18 или 20.

7. Способ по п. 5 или 6, где способ дополнительно включает идентификацию индивидуума как отвечающий индивидуум, например полностью или частично отвечающий индивидуум, или индивидуум, у которого не возникнет рецидива, основываясь на величине одного или более из указанного в подпунктах (i)-(ix) пункта 5; 35 необязательно где:

(a) отвечающий индивидуум, например полностью отвечающий индивидуум, имеет или идентифицирован как имеющий более высокий уровень одного, двух или более, всех из GZMK, PPF1BP2 или интактных Т-клеток по сравнению с не отвечающим индивидуумом;

(b) эффективность трансдукции, составляющая 15% или более согласно подпункту (vi) пункта 3, указывает на увеличенную способность к ответу или сниженную 40 вероятность рецидива;

(c) полностью отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент CD8+ Т-клеток по сравнению с процентом CD8+ Т-клеток у не 45 отвечающего индивидуума;

(d) полностью отвечающий индивидуум или частично отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент CD4+ Т-клеток по сравнению с процентом CD4+ Т-клеток у не отвечающего индивидуума;

(e) полностью отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент одного, двух, трех или более, например всех, из покоящихся клеток  $T_{EFF}$ , покоящихся клеток  $T_{REG}$ , более молодых Т-клеток, например более молодых CD4 или CD8 клеток, или гамма/дельта Т-клеток, или ранних Т-клеток памяти или их комбинации, по сравнению с числом покоящихся клеток  $T_{EFF}$ , покоящихся клеток  $T_{REG}$ , более молодых Т-клеток, например более молодых CD4 или CD8 клеток, или ранних Т-клеток памяти у не отвечающего индивидуума;

(f) частично отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент PD-1+/LAG-3+клеток, чем отвечающие индивидуумы в популяции CAR19-экспрессирующих клеток, или более высокий процент PD-1+/TIM-3+клеток, чем отвечающие индивидуумы в популяции CAR19-экспрессирующих клеток;

(g) высокий процент PD1+ CAR+ и LAG3+ или TIM3+ Т-клеток в образце, полученном посредством афереза, является фактором плохого прогноза для ответа индивидуума на терапию CAR19-экспрессирующими клетками, например терапию CAR19;

(h) отвечающий индивидуум, например полностью отвечающий индивидуум, на терапию CAR19 имеет или идентифицирован как имеющий профиль биомаркеров, приведенный в таблице 9;

(i) экспрессия одного, двух, трех, четырех или более, всех генов из KLRG1, CD57, CD27, CD122 или CD62L является прогностическим фактором ответа пациента на терапию CTL019;

(j) отвечающий индивидуум, например полностью отвечающий индивидуум, имеет один, два, три, или более, или все из следующих профилей:

(i) имеет более высокое число CD27+ иммунных эффекторных клеток по сравнению с числом CD27+ иммунных эффекторных клеток у не отвечающего индивидуума;

(ii) имеет более высокое число CD8+ Т-клеток по сравнению с числом CD8+ Т-клеток у не отвечающего индивидуума;

(iii) имеет более низкое число клеток, экспрессирующих один или более ингибиторов иммунной точки контроля, например ингибиторов иммунной точки контроля, выбранных из PD-1, LAG-3, TIM-3, или KLRG-1 или комбинации, по сравнению с числом клеток, экспрессирующих один или более ингибиторов иммунной точки контроля у не отвечающего индивидуума; или

(iv) имеет более высокое число одного, двух, трех или более, всех, из покоящихся клеток  $T_{EFF}$ , покоящихся клеток  $T_{REG}$ , более молодых клеток или ранних Т-клеток памяти или их комбинации, по сравнению с числом покоящихся клеток  $T_{EFF}$ , покоящихся клеток  $T_{REG}$ , интактных CD4-клеток, нестимулированных клеток памяти или ранних Т-клеток памяти у не отвечающего индивидуума;

(k) не отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий уровень одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи или более, например всех, из IL22, IL-2RA, IL-21, IRF8, IL8, CCL17, CCL22, эффективных Т-клеток или регуляторных Т-клеток, по сравнению с отвечающим индивидуумом;

(l) не отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процент одного, двух, трех или более, например всех, из активированных клеток  $T_{EFF}$ , активированных клеток  $T_{REG}$ , более старых Т-клеток, например более старых CD4 или CD8 клеток, или поздних Т-клеток памяти или их комбинации, по сравнению с числом активированных клеток  $T_{EFF}$ , активированных клеток  $T_{REG}$ , более старых Т-клеток, например более старых CD4 или CD8 клеток, или поздних Т-клеток

памяти у отвечающего индивидуума;

(m) не отвечающий индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий:

(i) более высокий процент экспрессирующих PD-1 или LAG-3 иммунных эффекторных клеток, например CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток, например CAR19-

5 экспрессирующих CD4+ клеток и/или CD8+ Т-клеток, по сравнению с процентом экспрессирующих PD-1 или LAG-3 иммунных эффекторных клеток у отвечающего индивидуума, или более высокий процент PD-1+/LAG-3+ клеток в популяции CAR19+ клеток по сравнению с отвечающим индивидуумом, например полностью отвечающим индивидуумом, при терапии CAR19-экспрессирующими клетками,

10 (ii) истощенный фенотип PD1+ CAR+ клеток и коэкспрессию LAG3 в популяции CAR19-экспрессирующих клеток, или

(iii) более высокий процент PD-1+/TIM-3+ клеток в популяции CAR19-экспрессирующих клеток по сравнению с отвечающим индивидуумом, например полностью отвечающим индивидуумом;

15 (n) не отвечающий на терапию CAR19 индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий биомаркер, содержащий одну или несколько из PD-1+ иммунных эффекторных клеток, TIM-3+ иммунных эффекторных клеток, LAG-3+ иммунных эффекторных клеток, KLRG1+ иммунных эффекторных клеток, CD27-иммунных эффекторных клеток, активированных клеток T<sub>EFF</sub>, активированных клеток T<sub>REG</sub>, активированных TH1-клеток, активированных TH2-клеток, стимулированных клеток памяти или поздних Т-клеток памяти или их комбинации;

(o) не отвечающий на терапию CAR19 индивидуум имеет или идентифицирован как имеющий профиль биомаркеров, приведенный в таблице 10; или

25 (p) индивидуум, у которого возникнет рецидив, имеет или идентифицирован как имеющий повышенные уровни одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более из C5orf32, CCL17, CSF1, CTSL1, EMP1, EPAS1, GCLM, GK, GPR56, HMOX1, IKBIP, IL10, IL13, IL1RN, IL4, IL5, IL9, MIR155, PANX2, PGAM4, PRKAR1B, TNFRSF11A, TNFRSF1B, TNFRSF8, VTRNA1-3 или ZNF282.

30 8. Способ по любому из пп. 2-6, дополнительно включающий введение ингибиторов иммунной точки контроля в комбинации с продуктом CAR19-экспрессирующих клеток.

9. Способ по любому из пп. 1-8, дополнительно включающий обогащение более молодыми Т-клетками или интактными Т-клетками до введения нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR19, при изготовлении продукта CAR19-экспрессирующих клеток.

10. Способ по пп. 1-9, где:

35 i) продукт CAR19-экспрессирующих клеток содержит множество CAR19-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток;

40 ii) величина уровня CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток или величина одного или более согласно подпунктам (i)-(vii) пункта 3 получена от образца индивидуума, полученного посредством афереза, где необязательно образец, полученный посредством афереза, оценивают до инфузии или повторной инфузии;

iii) индивидуум оценивают до, в течение или после приема продукта CAR19-экспрессирующих клеток;

iv) рак выбран из ALL или CLL;

v) индивидуумом является пациент, являющийся человеком;

45 vi) величина уровня CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток или величина одного или более согласно подпунктам (i)-(vii) пункта 3 оценивает профиль одного или более из экспрессии генов, проточной цитометрии или экспрессии белка; и/или

vii) уровень CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток оценивают с

использованием профиля или сигнатуры, указывающей процент CD27+ CD45RO-иммунных эффекторных клеток в образце.

11. Способ оценки эффективности продукта CAR19-экспрессирующих клеток при лечении гематологической злокачественной опухоли, причем указанный способ

5 включает:

получение величины уровня CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток в популяции CD8+ Т-клеток в продукте CAR19-экспрессирующих клеток,

10 где повышение уровня CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток по сравнению с уровнем CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток у не отвечающего индивидуума указывает на повышенную эффективность продукта CAR19-экспрессирующих клеток.

12. Способ по п. 11, дополнительно включающий получение величины для одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи или более, например всех, из:

15 (i) уровень одного, двух, трех или более, например всех, из покоящихся клеток T<sub>EFF</sub>, покоящихся клеток T<sub>REG</sub>, более молодых Т-клеток, например более молодых CD4 или CD8 клеток, или гамма/дельта Т-клеток, или ранних Т-клеток памяти или их комбинации в продукте CAR19-экспрессирующих клеток;

20 (ii) уровень одного, двух, трех или более, например всех, из активированных клеток T<sub>EFF</sub>, активированных клеток T<sub>REG</sub>, более старых Т-клеток, например более старых CD4 или CD8 клеток, или поздних Т-клеток памяти или их комбинации в продукте CAR19-экспрессирующих клеток;

25 (iii) уровень маркера истощения иммунных клеток, например, одного, двух или нескольких ингибиторов иммунной точки контроля, например PD-1, TIM-3 и/или LAG-3, в продукте CAR19-экспрессирующих клеток;

30 (iv) уровень одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, двадцати или более из биомаркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, например CCL20, IL-17а и/или IL-6, таблице 16, таблице 17, таблице 18, таблице 20, на фиг.2В, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1 или сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19;

(v) уровень цитокинов, например набора цитокинов, в образце продукта CAR19-экспрессирующих клеток, например CTL019, где цитокин выбран из одного, двух, трех, четырех, пяти, или более, или всех из цитокинов, приведенных в таблице 16;

35 (vi) эффективность трансдукции CAR19-экспрессирующих клеток в продукте;

(vii) количество CD27+ PD-1- клеток в образце, например в образце, полученном посредством афереза, или образце продукта CAR19-экспрессирующих клеток, например CTL019, например количество, превышающее или равное  $1 \times 10^7$  клеток; или

(viii) уровень клеток T<sub>REG</sub> или клеточной популяции,

40 где увеличение (i), (v), (vi), (vii) или любой их комбинации указывает на увеличенную эффективность продукта CAR19-экспрессирующих клеток, и

где увеличение (ii), (iii), (viii) или любой их комбинации указывает на снижение эффективности продукта CAR19-экспрессирующих клеток;

и необязательно где

45 (a) цитокин выбран из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, или более, или всех из CCL20/MIP3а, IL17А, IL6, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL10, IL13, IL2, IL21, IL4, IL5, IL9 или TNF $\alpha$ , или их комбинации; или

(b) эффективность трансдукции, составляющая 15% или выше, указывает на

повышенную эффективность.

13. Способ по п. 11 или 12, где продукт CAR19-экспрессирующих клеток содержит CTL019.

14. Способ оптимизации производства продукта CAR19-экспрессирующих клеток, включающий:

(1) получение образца популяции CAR19-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток;

(2) активацию CAR19-экспрессирующей клетки *in vitro*;

(3) оценку эффективности активированных CAR19-экспрессирующих клеток при лечении гематологической злокачественной опухоли посредством определения уровня CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток в популяции CD8+ Т-клеток, в продукте CAR19-экспрессирующих клеток,

где повышение уровня CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток по сравнению с уровнем CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток у не отвечающего

индивидуума указывает на повышенную эффективность продукта CAR19-экспрессирующих клеток,

тем самым оптимизируя производство продукта.

15. Способ по п. 14, где оценка эффективности активированных CAR19-экспрессирующих клеток дополнительно включает определение одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи или более, например всех, из:

(i) уровня одного, двух, трех или более, например всех, из покоящихся клеток T<sub>EFF</sub>, покоящихся клеток T<sub>REG</sub>, более молодых Т-клеток, например более молодых CD4 или CD8 клеток, или гамма/дельта Т-клеток, или ранних Т-клеток памяти или их комбинации в продукте CAR19-экспрессирующих клеток;

(ii) уровня одного, двух, трех или более, например всех, из активированных клеток T<sub>EFF</sub>, активированных клеток T<sub>REG</sub>, более старых Т-клеток, например более старых CD4 или CD8 клеток, или поздних Т-клеток памяти или их комбинации в продукте CAR19-экспрессирующих клеток;

(iii) уровня маркера истощения иммунных клеток, например, одного, двух или нескольких ингибиторов иммунной точки контроля, например PD-1, TIM-3 и/или LAG-3, в продукте CAR19-экспрессирующих клеток;

(iv) уровня одного, двух, трех, четырех, пяти, десяти, двадцати или более из биомаркеров, приведенных в таблице 1А, таблице 1В, таблице 7А, таблице 7В, таблице 8, таблице 9, таблице 10, таблице 14, например CCL20, IL-17а и/или IL-6, таблице 16, таблице 17, таблице 18, таблице 20, на фиг.2В, PD-1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1 или сигнатуры набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19;

(v) уровня цитокинов в образце продукта CAR19-экспрессирующих клеток, например CTL019, где цитокин выбран из одного, двух, трех, четырех, пяти, или более, или всех из цитокинов, приведенных в таблице 16;

(vi) эффективность трансдукции CAR19-экспрессирующих клеток в продукте;

(vii) количество CD27+ PD-1- клеток в образце, например в образце, полученном посредством афереза, или образце продукта CAR19-экспрессирующих клеток, например

CTL019, например количество, превышающее или равное  $1 \times 10^7$  клеток; или

(viii) уровня клеток T<sub>REG</sub> или клеточной популяции,

где увеличение (i), (v), (vi), (vii) или любой их комбинации указывает на увеличенную эффективность продукта CAR19-экспрессирующих клеток, и

где увеличение (ii), (iii), (viii) или любой их комбинации указывает на снижение эффективности продукта CAR19-экспрессирующих клеток,  
и необязательно где

- 5 (a) способ дополнительно включает стадию увеличения в количестве, например выделения, клеток, имеющих увеличение любого из (i), (v), (vi), (vii) или любой их комбинации, или снижение любого из (ii), (iii), (viii) или любой их комбинации, или  
(b) уровень цитокинов выбран из одного или нескольких из уровня цитокинов CCL20/ MIP3a, IL17A, IL6, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL10, IL13, IL2, IL21, IL4, IL5, IL9 или TNF $\alpha$ , или их комбинации.

10 16. Способ по п. 14 или 15, где продукт CAR19-экспрессирующих клеток содержит CTL019.

17. Способ по любому из пп. 14-17, который дополнительно включает стадию истощения клеток T<sub>REG</sub>, необязательно где клетки T<sub>REG</sub> истощают путем истощения CD25, истощения GITR, ингибирования mTOR или их комбинации.

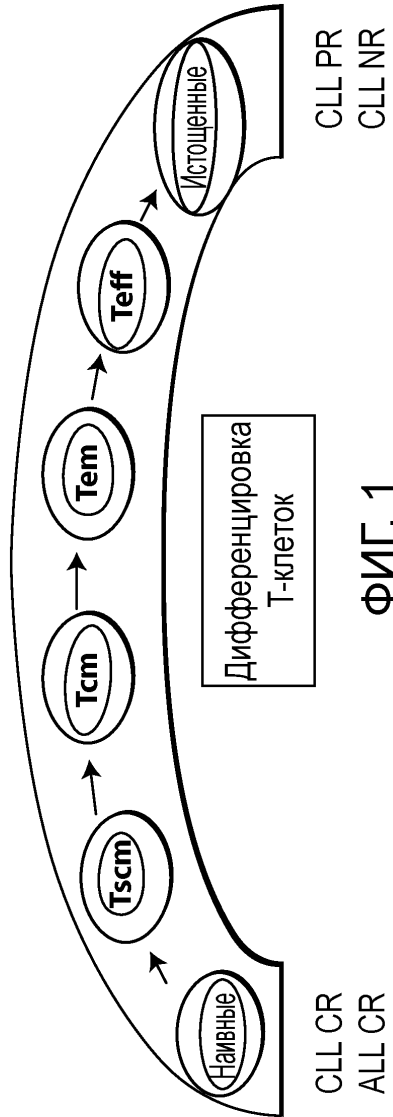
- 15 18. Способ по любому из пп.11-17, где  
(a) уровень CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток, или (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) согласно п. 10 или 12 или любую их комбинацию, например все, оценивают после активации *in vitro*, и/или  
(b) продукт CAR19-экспрессирующих клеток содержит CTL019.

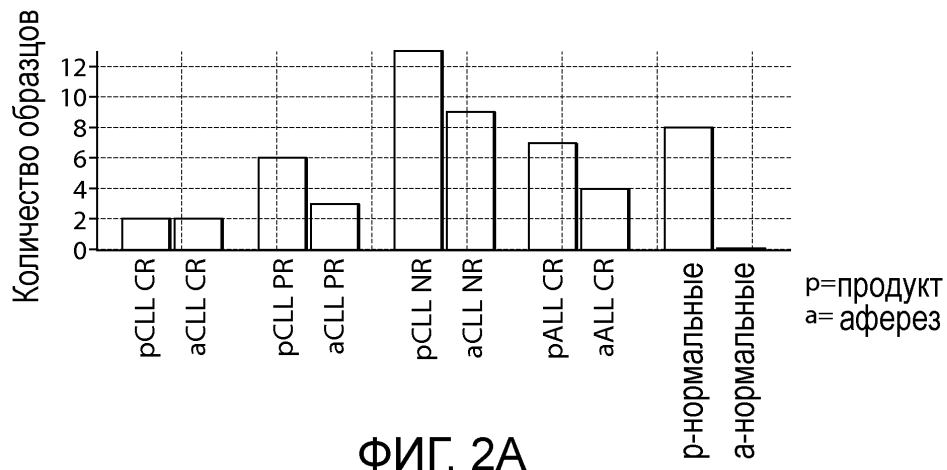
20 19. Способ по любому из пп. 1-18, где  
(i) индивидууму проводят лечение, например предварительное лечение или сопутствующее лечение, средством, например ингибитором mTOR и/или ингибитором точки контроля, например предварительное лечение до начала терапии CAR19-экспрессирующими клетками или лечение после терапии CAR19-экспрессирующими  
25 клетками;

(ii) гематологическая злокачественная опухоль связана с CD19 экспрессией;

(iii) гематологическая злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из В-клеточного острого лимфоцитарного лейкоза (B-ALL), Т-клеточного острого лимфоцитарного лейкоза (Т-ALL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического миелогенного лейкоза (СМL), хронического лимфоцитарного лейкоза (СLЛ), В-клеточного промиелоцитарного лейкоза, новообразования из бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных  
35 лимфопролиферативных состояний, лимфомы MALT, лимфомы из клеток мантийной зоны, лимфомы из клеток маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии и миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, плазмабластной лимфомы, новообразования из плазмацитоидных дендритных клеток и макроглобулинемии Вальденстрема; и/или

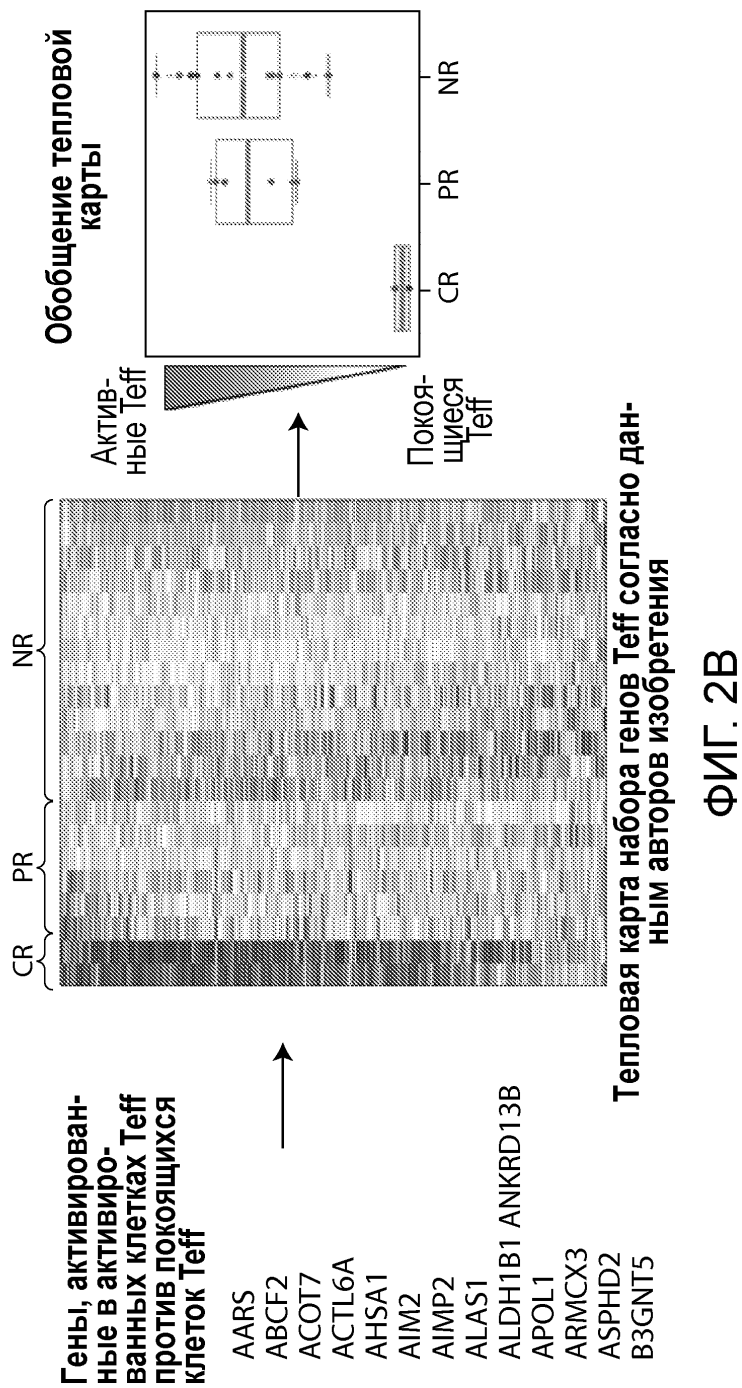
40 (iv) сигнатура набора генов клеток, экспрессирующих CAR против CD19, включает величину экспрессии по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9 или 10 генов, включающую генную сигнатуру клеток, экспрессирующих CAR против CD19.

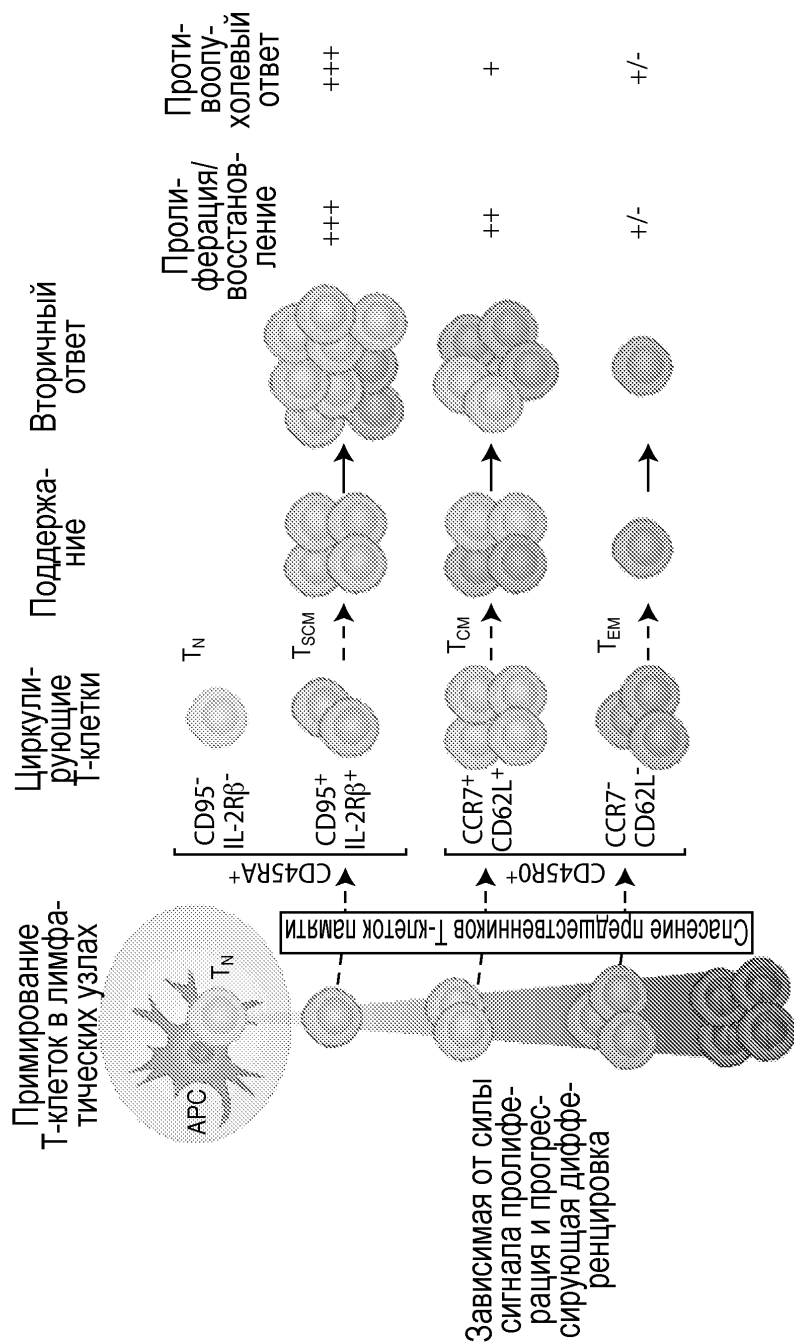




ФИГ. 2А

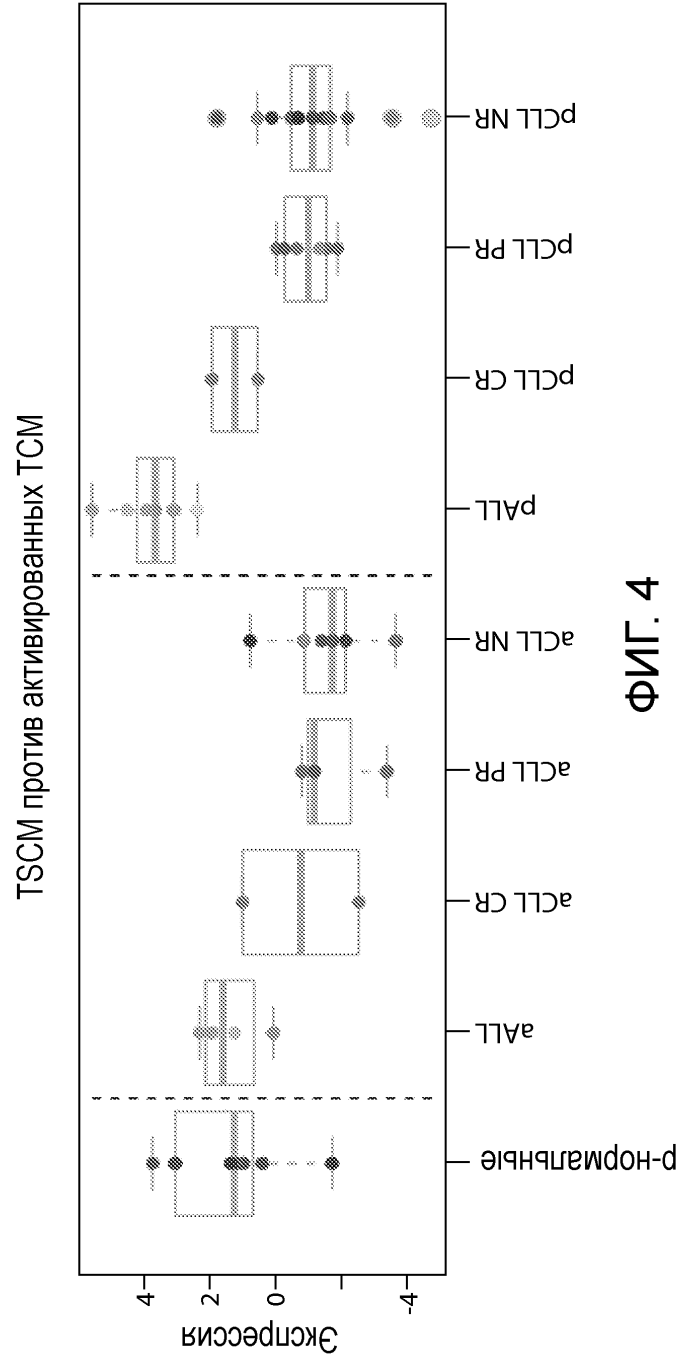




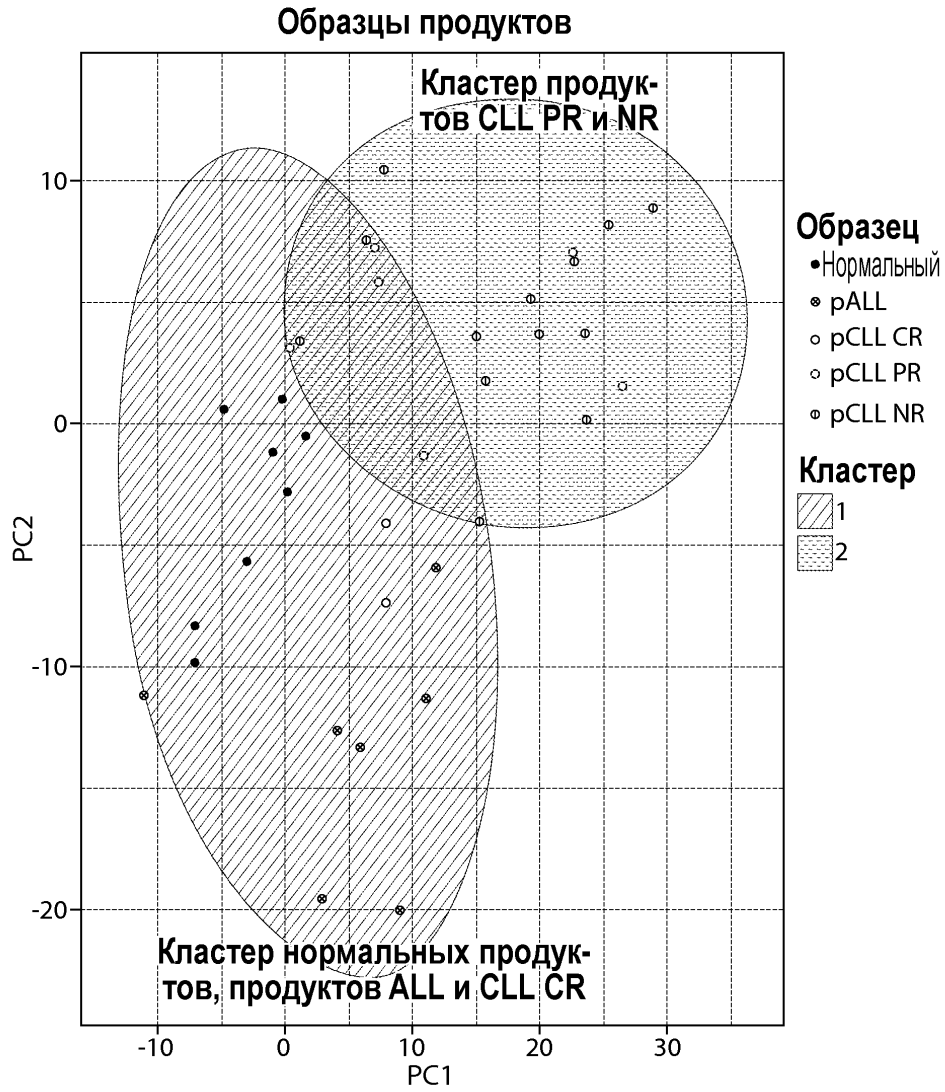


Короткоживущие эффекторные Т-клетки

ФИГ. 3



6/29

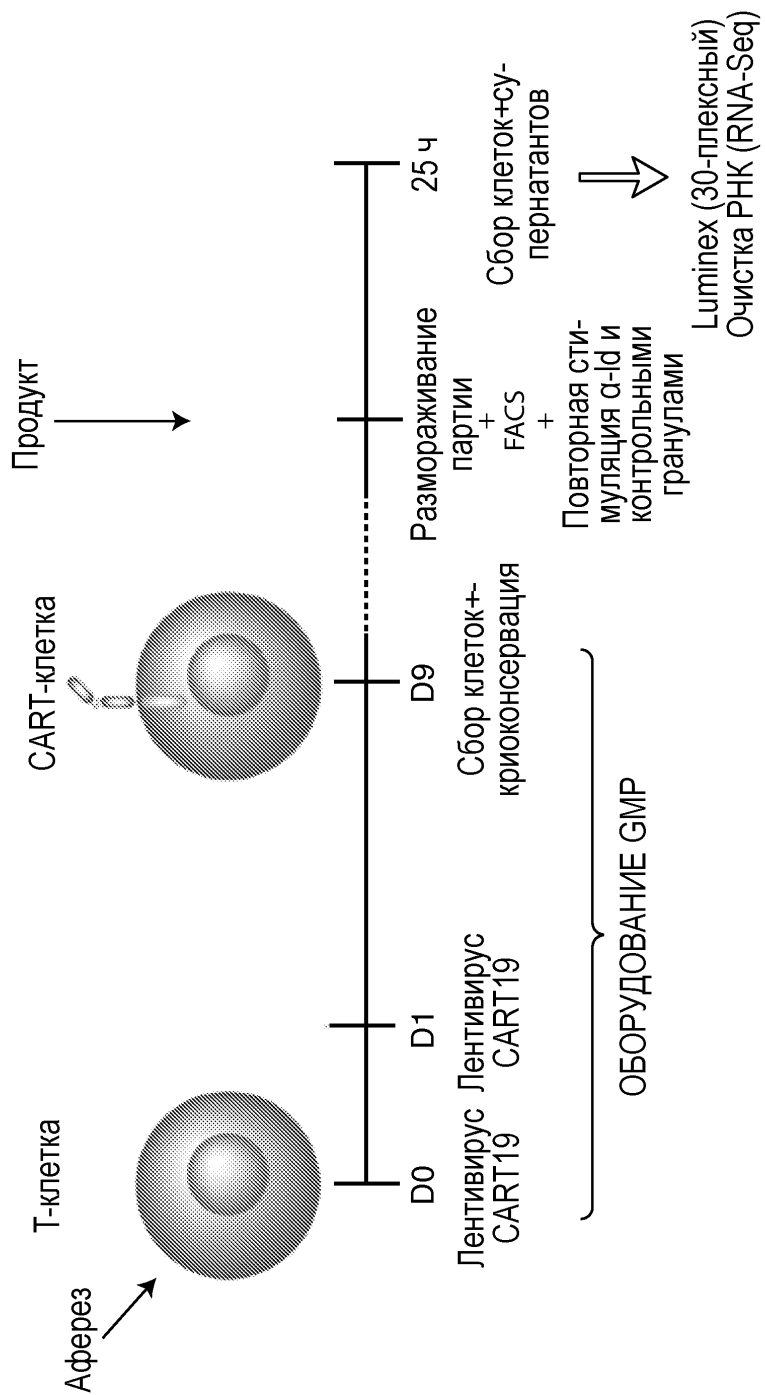


ФИГ. 5А

7/29

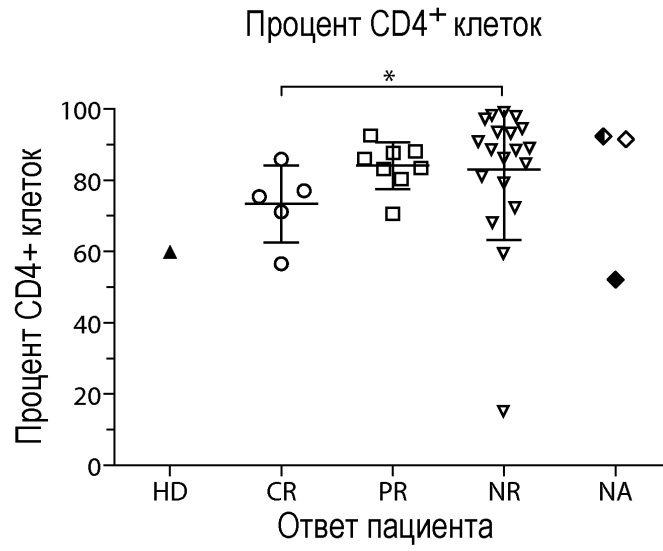


ФИГ. 5В

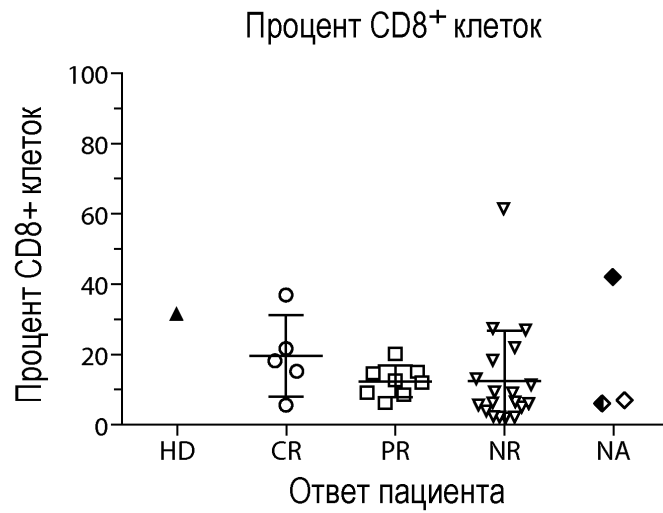


ФИГ. 6

9/29



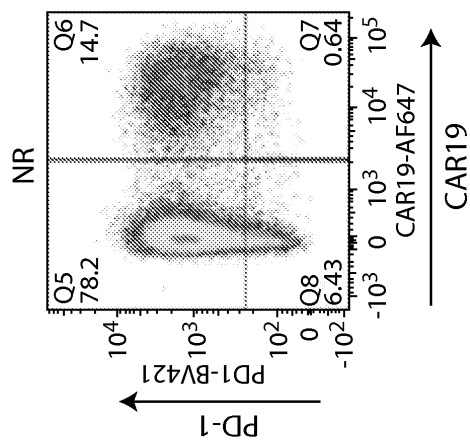
ФИГ. 7А



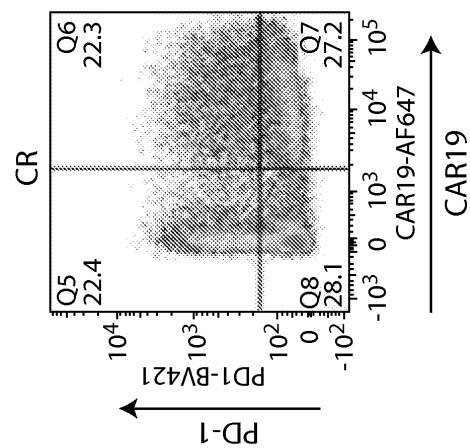
ФИГ. 7В

10/29

Гейтированные по CD4+



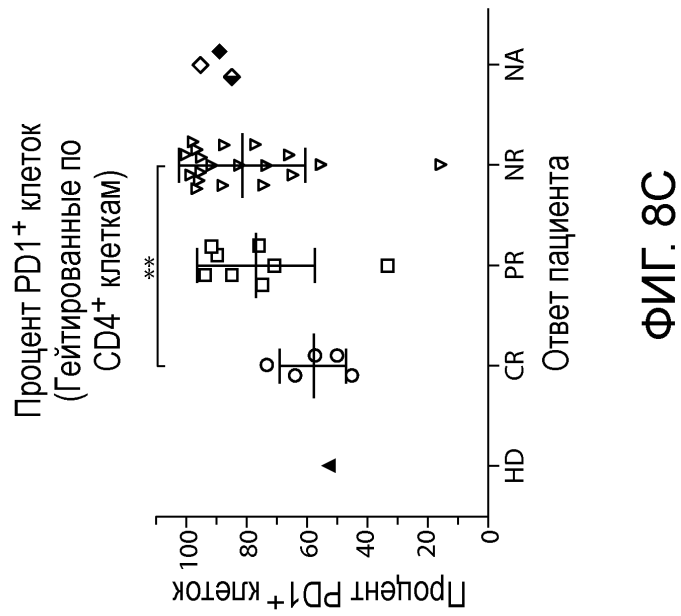
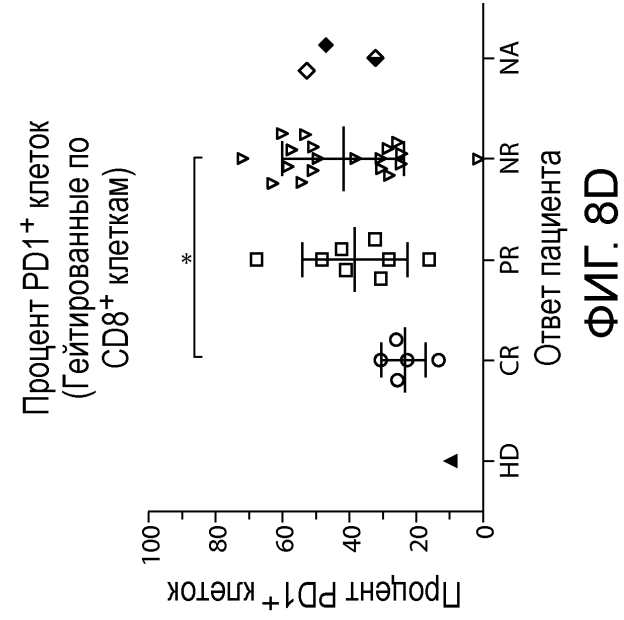
ФИГ. 8В



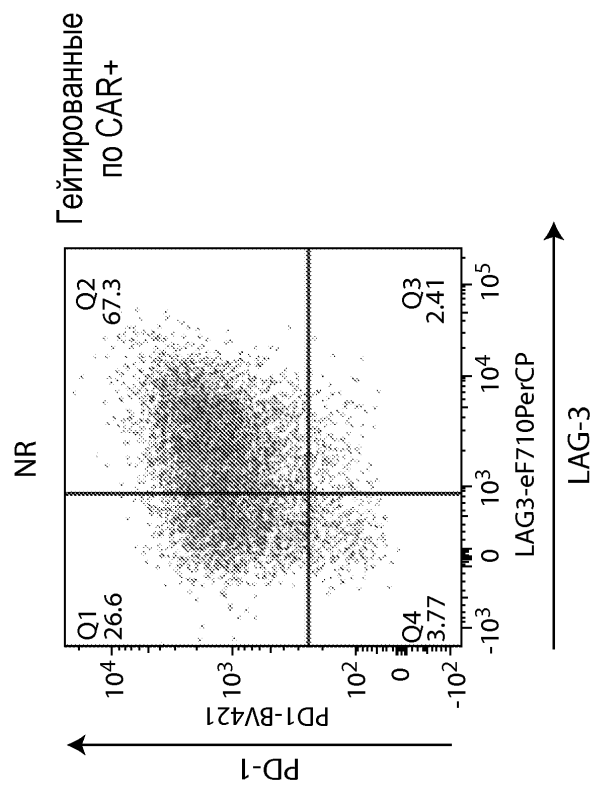
ФИГ. 8А



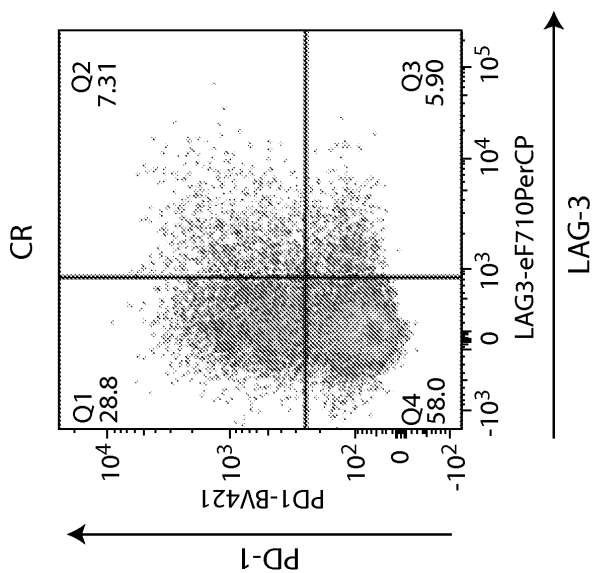
11/29



12/29



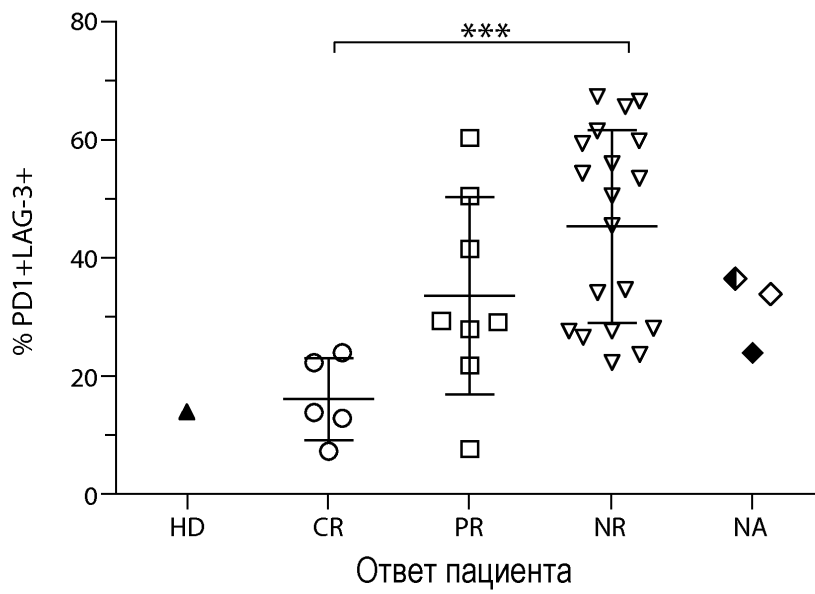
ФИГ. 9B



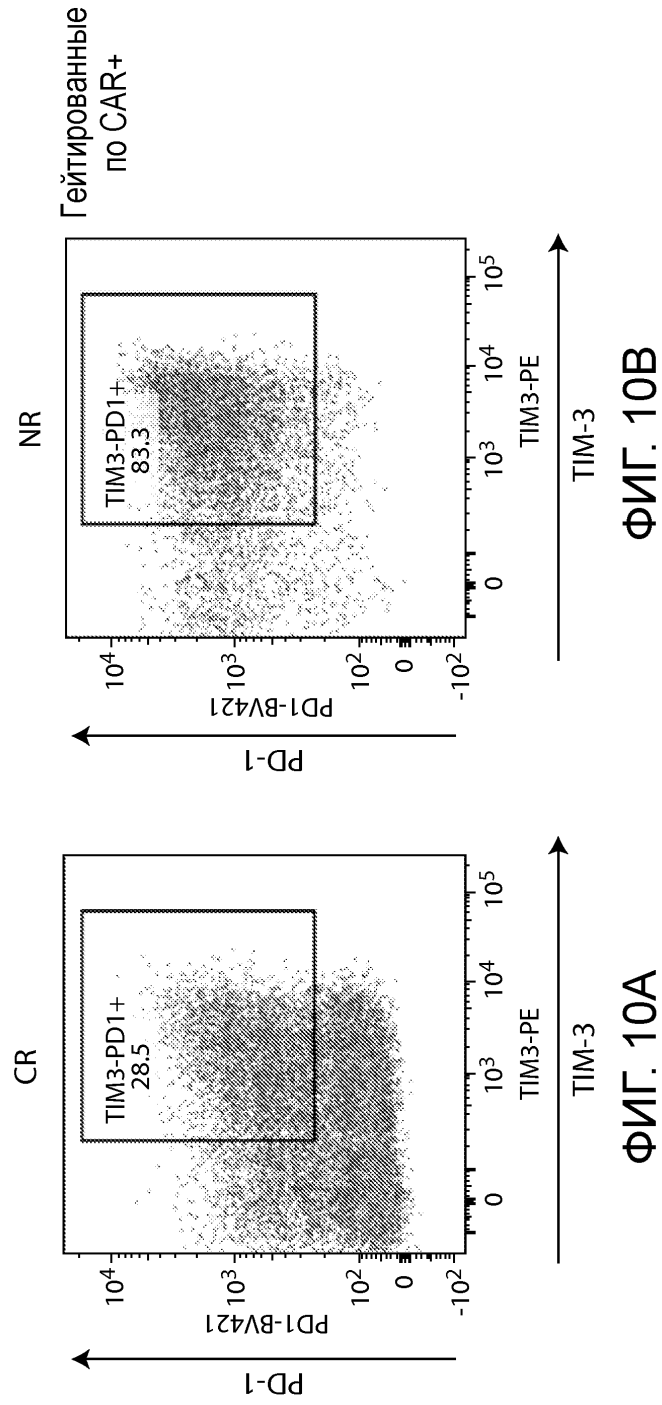
ФИГ. 9A

13/29

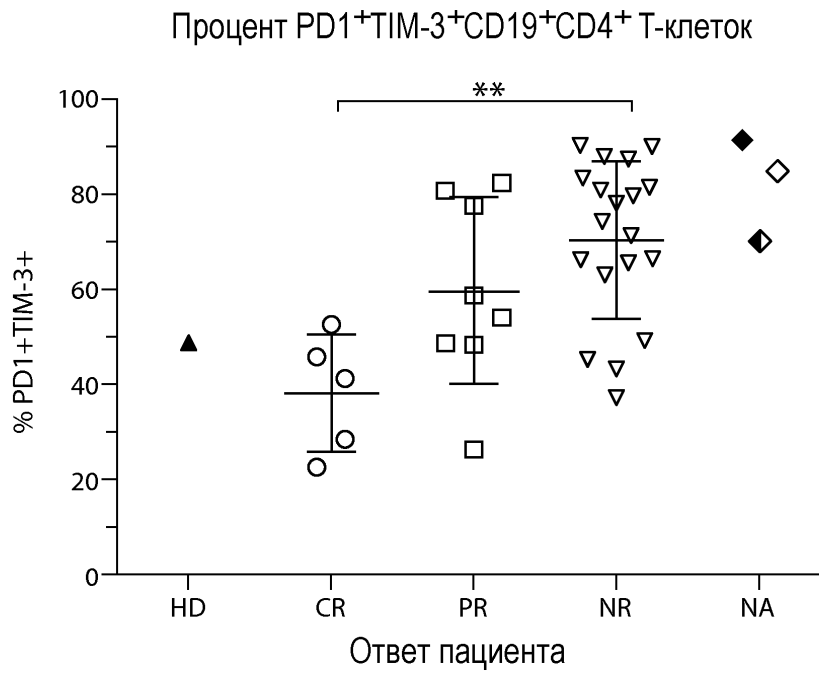
Процент PD1<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клеток



ФИГ. 9С

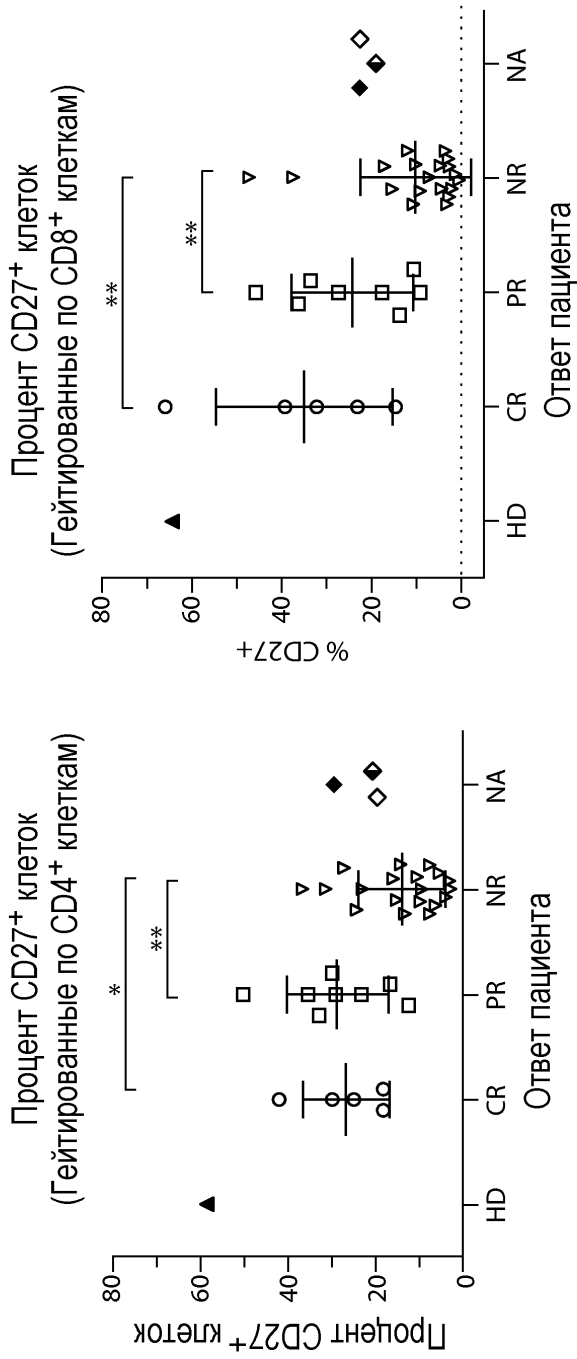


15/29



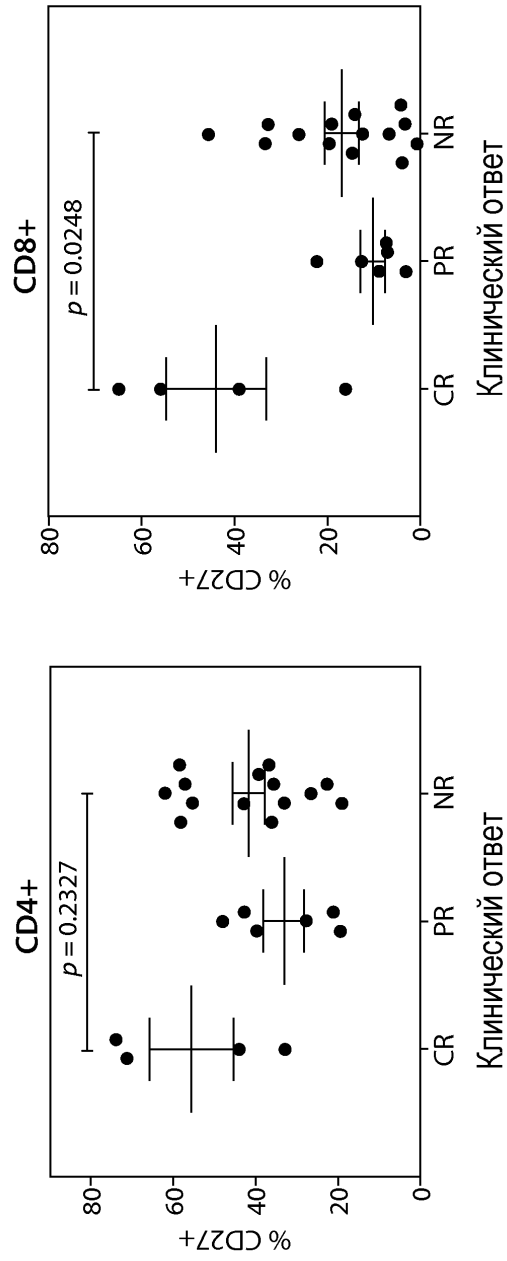
ФИГ. 10С

16/29

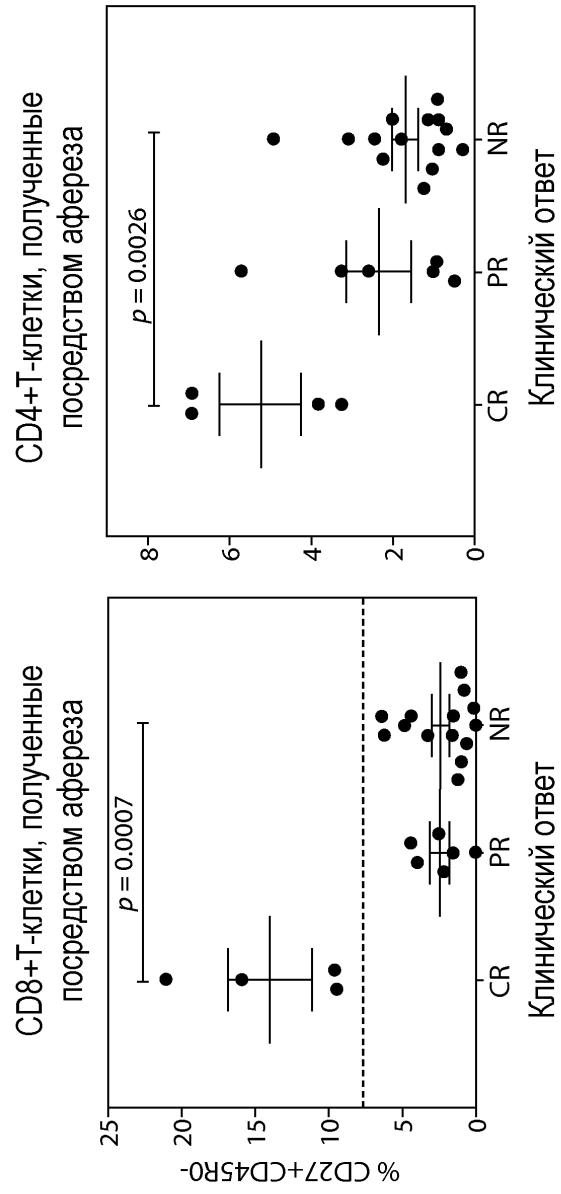


ФИГ. 11

17/29



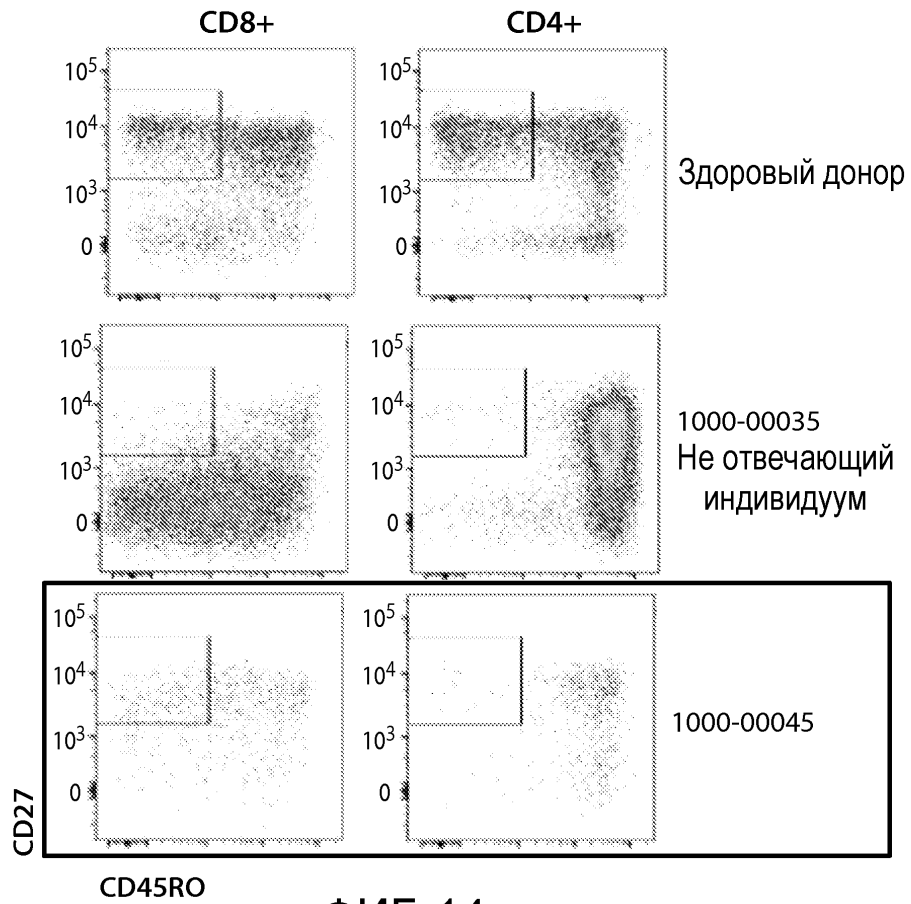
ФИГ. 12



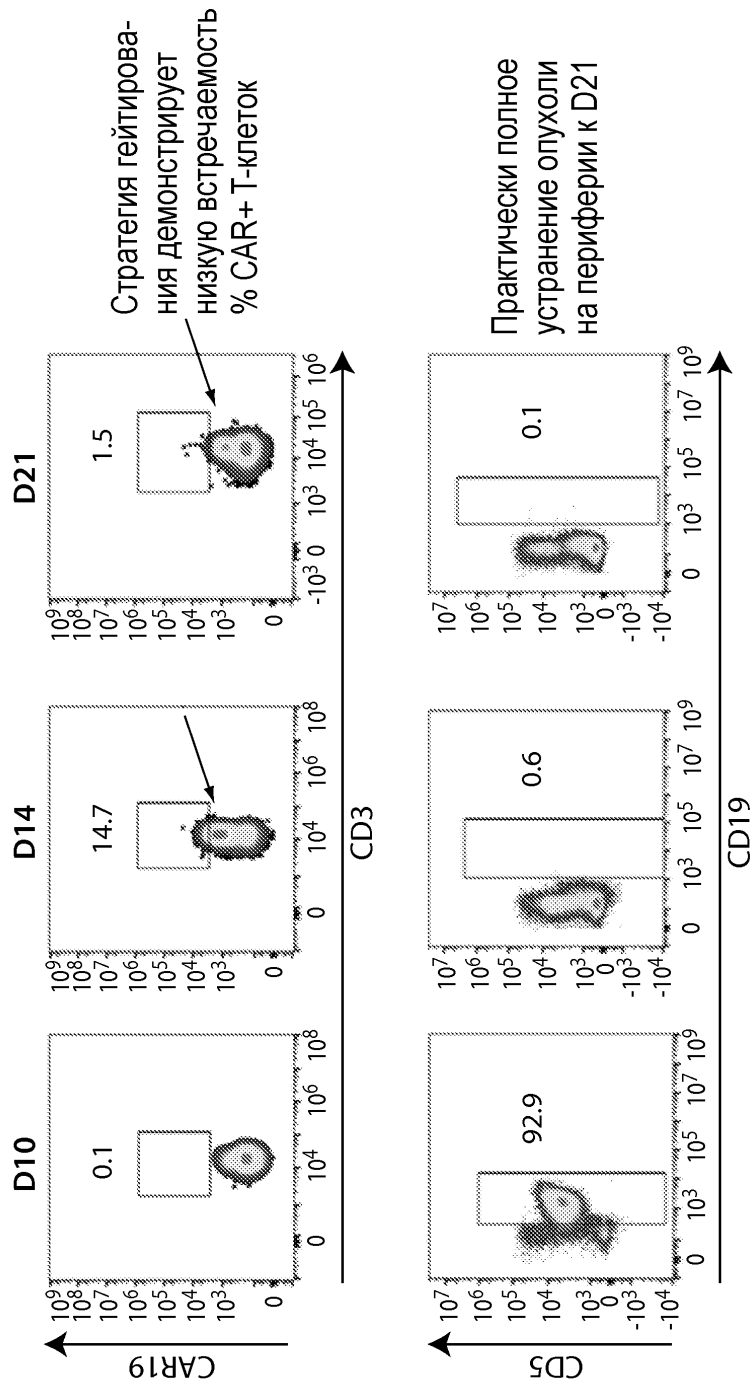
ФИГ. 13



19/29

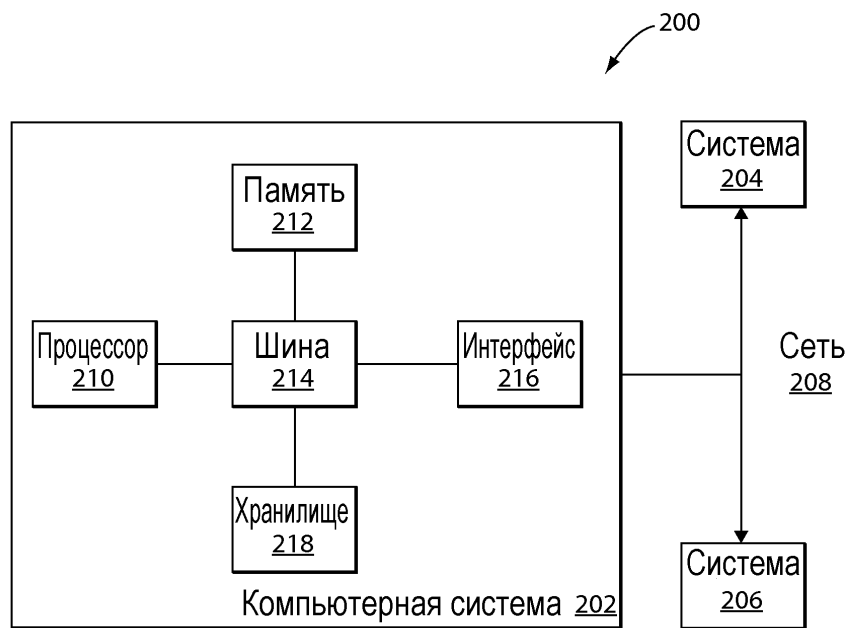


ФИГ. 14



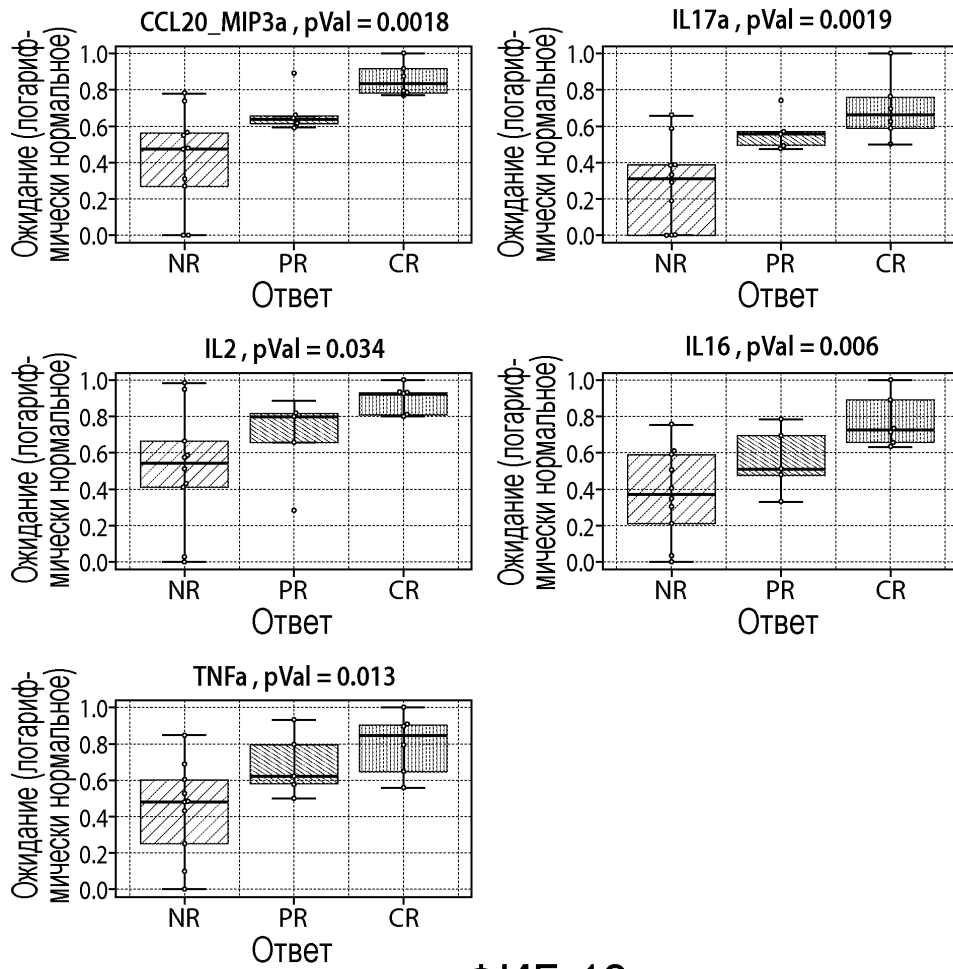
ФИГ. 15

21/29



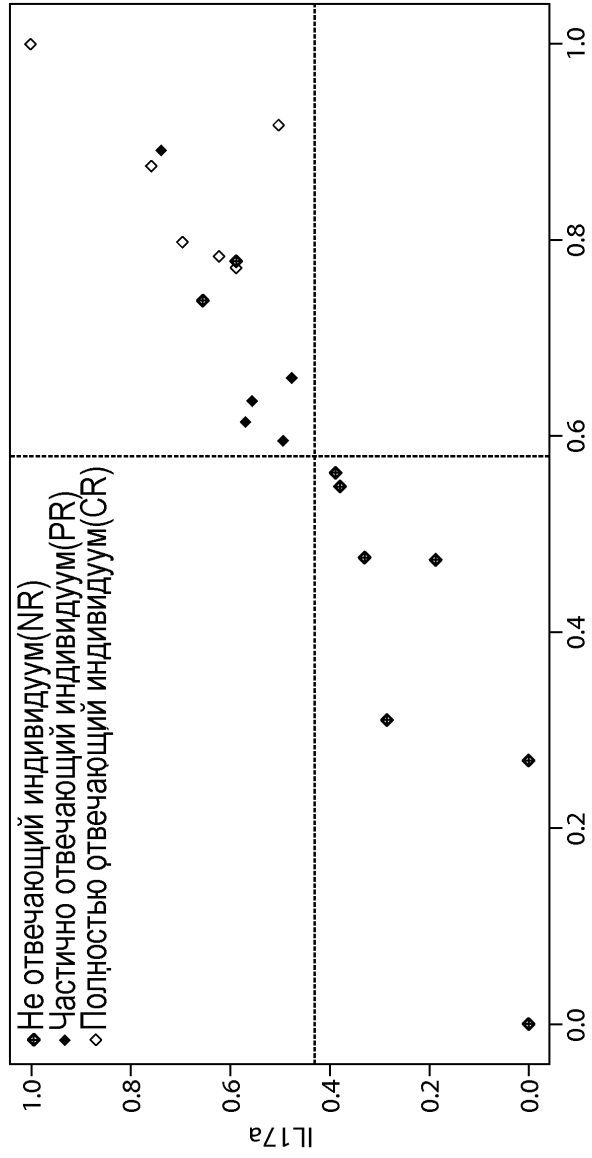
ФИГ. 16





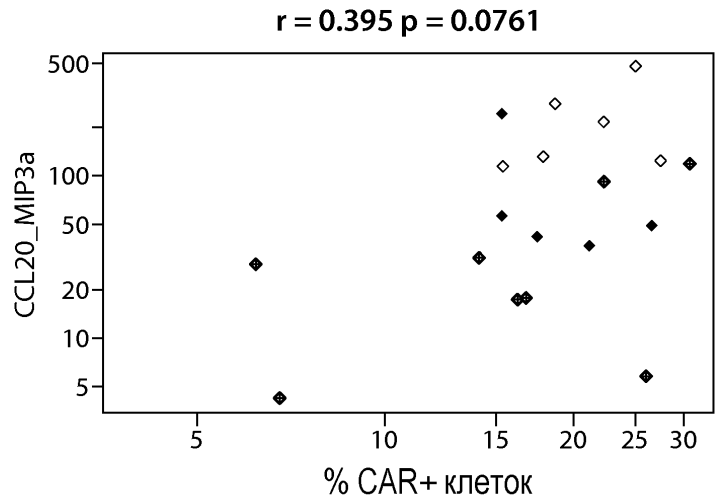
ФИГ. 18

$r = 0.928$ , значение  $p = 1,36e-09$

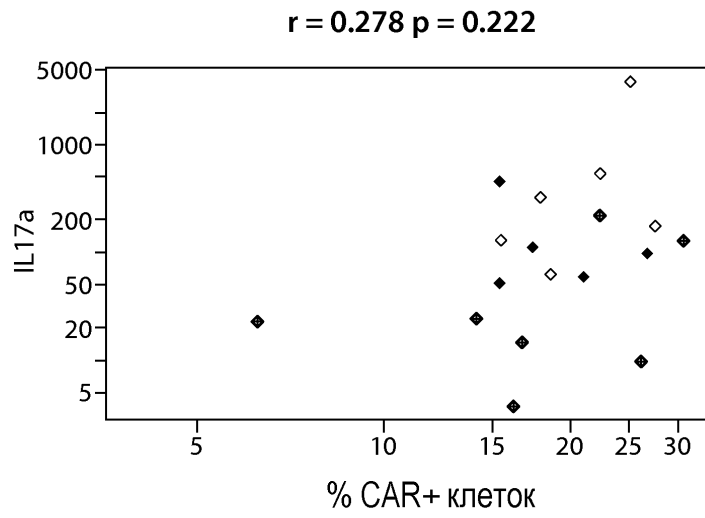


CCL20\_MIP3a  
ФИГ. 19А

25/29



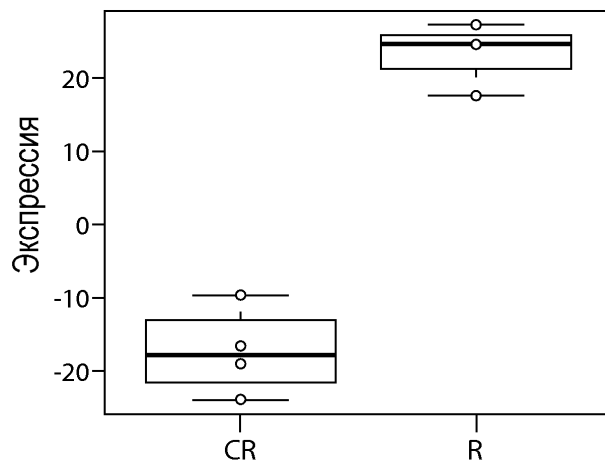
ФИГ. 19В



ФИГ. 19С

26/29

Нормализованный уровень Treg против Teff, 0 ч



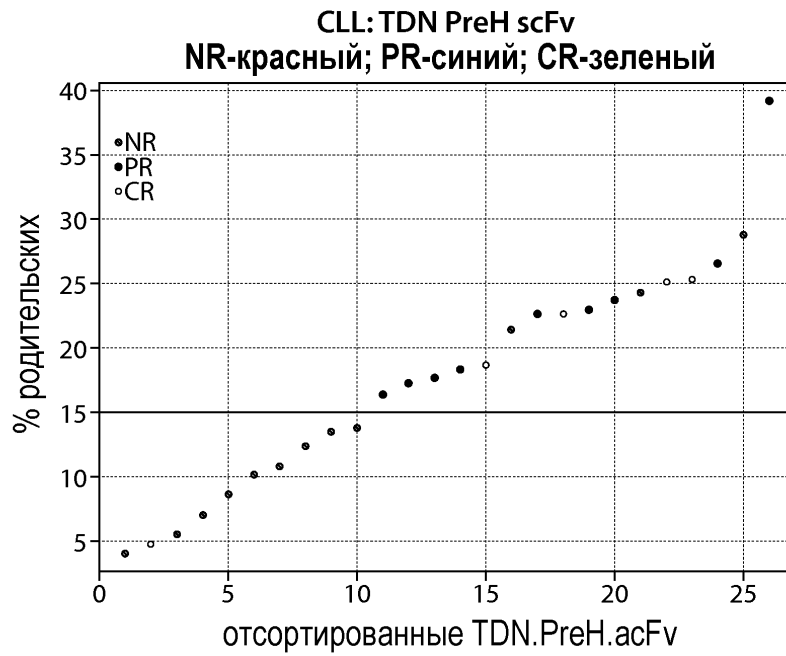
p=0.000215

ФИГ. 20



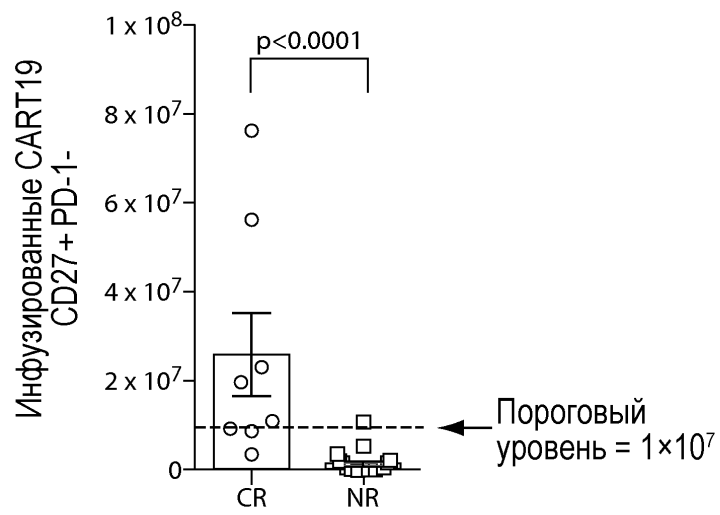
27/29

При CLL % CAR+ клеток на уровне до сбора отличает отвечающих индивидуумов  
 Уровень трансдукции может указывать на ответ при CLL



ФИГ. 21





ФИГ. 23