

ÖZET**KANSER TEDAVİSİ İÇİN KİMERİK ANTİJEN RESEPTÖRÜ-MODİFİYE EDİLMİŞ T HÜCRELERİNİN KULLANILMASI**

- 5 Mevcut buluş, bir insanda kanseri tedavi etmek için bileşimler ve yöntemler sağlar. Buluş, bir CAR eksprese etmek için bir genetik olarak modifiye edilmiş T hücrelerini uygulama ile ilgilidir, burada CAR, bir antijen bağlama alanı, bir transmembran alanı, bir ko-stimülatör sinyalleme alanı ve bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir.

İSTEMLER

1. Bir insanda kanseri tedavi etmek için bir yöntemde kullanılması için, bir CAR eksprese etmesi için genetik olarak modifiye edilmiş bir T hücresi olup, burada
5 CAR, (a) bir anti-CD19 scFv olan bir antijen bağlama alanı, (b) bir eş-stimülatör 4-1BB sinyalleme bölgesi ve (c) bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir, burada anti-CD19 scFv, SEQ ID NO:20'nin amino asit dizisini içerir ve/veya CD3 zeta sinyalleme alanı, SEQ ID NO:24'ün amino asit dizisini içerir ve insan en az bir kemoterapötik ajana dirençlidir.
10
2. İstem 1'e göre kullanılması için T hücresi olup, burada kanser, bir solid-olmayan tümör, örneğin, bir hematolojik tümörü içerir.
3. İstem 2'ye göre kullanılması için T hücresi olup, burada kanser lösemidir veya lenfomadır.
15
4. İstem 3'e göre kullanılması için T hücresi olup, burada lösemi aşağıdakilerden biridir:
20
 - (i) bir akut lösemi veya kronik lösemi; veya
 - (ii) akut lenfositik lösemi.
5. İstem 1'e göre kullanılması için T hücresi olup, burada kanser aşağıdakilerden biridir:
25
 - (i) pre-B akut lenfositik lösemi (pediatrik endikasyon), erişkin-tip akut lenfositik lösemi, mantle hücreli lenfoma veya difüz büyük B-hücreli lenfoma;
 - (ii) Hodgkin-dışı lenfoma;
 - (iii) multipl miyelom; veya
 - (iv) Hodgkin hastalığı.
30
6. İstem 1'e göre kullanılması için T hücresi olup, burada kanser kronik lenfositik lösemidir.
7. Kanseri tedavi etmek için söz konusu T hücrelerini kanser tanısı almış bir insana uygulamayı içeren bir yöntemde kullanılması amacıyla, bir CAR eksprese etmesi için genetik olarak mühendislik uygulanmış bir T hücresi olup, burada
35

- CAR (a) bir anti-CD19 scFv olan bir antijen bağlama alanı, (b) bir eş-stimülatör 4-1BB sinyalleme bölgesi ve (c) bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir, burada anti-CD19 scFv, SEQ ID NO:20'nin amino asit dizisini içerir veya CD3 zeta sinyalleme alanı, SEQ ID NO:24'ün amino asit dizisini içerir ve söz konusu yöntem insanda uygulamadan sonra en az sekiz ay, dokuz ay, on ay, on bir ay, on iki ay, iki yıl veya üç yıl boyunca kalmaya devam eden genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücrelerinin bir popülasyonunu üretir ve burada insan en az bir kemoterapötik ajana dirençlidir.
- 5
- 10 8. İstem 7'ye göre kullanılması için T hücresi olup, burada genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücrelerinin kalmaya devam eden popülasyonu, insana uygulanmış bir T hücresinden, insana uygulanmış bir T hücresinin bir projesinden ve bunların bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilen en az bir hücre içerir.
- 15 9. İstem 7'ye göre kullanılması için T hücresi olup, burada genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücrelerinin kalmaya devam eden popülasyonu, bir hafıza T hücresi içerir.
- 20 10. Kanseri tedavi etmek için söz konusu T hücresini kanser tanısı almış bir insana uygulamayı içeren bir yöntemde kullanılması amacıyla, bir CAR eksprese etmesi için genetik olarak mühendislik uygulanmış bir T hücresi olup, burada CAR (a) bir anti-CD19 scFv olan bir antijen bağlama alanı, (b) bir eş-stimülatör 4-1BB sinyalleme bölgesi ve (c) bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir, burada anti-CD19 scFv, SEQ ID NO:20'nin amino asit dizisini içerir veya CD3 zeta sinyalleme alanı, SEQ ID NO:24'ün amino asit dizisini içerir, söz konusu yöntem insanda genetik olarak mühendislik uygulanmış t hücrelerinin bir popülasyonunu genişletir ve burada insan en az bir kemoterapötik ajana dirençlidir.
- 25
- 30 11. İstem 10'a göre kullanılması için T hücresi olup, burada uygulanan genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücresi, bir hafıza T hücresi içeren insanda projeni T hücrelerini üretir.
- 35 12. İstem 10'a göre kullanılması için T hücresi olup, burada uygulanan genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücresi, insanda uygulamadan sonra en az üç ay, dört ay, beş ay, altı ay, yedi ay, sekiz ay, dokuz ay, on ay, on bir ay, on iki

ay, iki yıl veya üç yıl boyunca kalmaya devam eden projeni T hücrelerinin popülasyonunu üretir.

- 5 13. İstemler 7-12'den herhangi birine göre kullanılması için T hücresi olup, burada kanser 2 ila 5 arasındaki istemlerin herhangi birinde tanımlandığı şekildedir veya burada kanser kronik lenfositik lösemidir.
- 10 14. İstemler 6, 7 veya 10'dan herhangi birine göre kullanılması için T hücresi olup, burada insan refrakter CD19+ lösemi ve lenfoma olan kronik lenfositik lösemiye sahiptir.
- 15 15. İstemler 1-14'ten herhangi birine göre kullanılması için T hücresi olup, burada T hücresi bir otolog veya allojeneik hücredir.
- 15 16. İstemler 1-15'ten herhangi birine göre kullanılması için T hücresi olup, burada söz konusu hücre, örneğin, CD20 ile reaksiyona giren ajanlar, örn., Rituksan, ile B-hücreli ablatif terapiyi takiben uygulanır.
- 20 17. İstemler 1-16'dan herhangi birine göre kullanılması için T hücresi olup, burada söz konusu hücre bir farmasötik bileşim içinde 10^4 ila 10^9 hücre/kg vücut ağırlığı veya 10^5 ila 10^6 hücre/kg vücut ağırlığı olan bir dozajda uygulanır.
- 25 18. İstemler 1 ila 17'den herhangi birine göre kullanılması için T hücresi olup, burada:
- 30 (i) ko-stimülatör 4-1BB sinyalleme bölgesi, SEQ ID NO: 23'ün amino asit dizisini içerir;
- (ii) CAR, SEQ ID NO: 12'de izah edilen amino asit dizisini içerir;
- (iii) anti-CD19 scFv, SEQ ID NO: 14 ile şifrelenir;
- 35 (iv) 4-1BB sinyalleme bölgesi, SEQ ID NO: 17 ile şifrelenir ve CD3 zeta sinyalleme alanı, SEQ ID NO: 18 ile şifrelenir;
- (v) anti-CD19 scFv, SEQ ID NO: 14 ile şifrelenir, 4-1BB sinyalleme bölgesi, SEQ ID NO: 17 ile şifrelenir ve CD3 zeta sinyalleme alanı, SEQ ID NO: 18 ile şifrelenir; veya
- 35 (vi) CAR, SEQ ID NO: 8'de izah edilen nükleik asit dizisi ile şifrelenir.

TARİFNAME
KANSER TEDAVİSİ İÇİN KİMERİK ANTİJEN RESEPTÖRÜ-MODİFİYE EDİLMİŞ T
HÜCRELERİNİN KULLANILMASI

5 BULUŞUN ALT YAPISI

Kronik lenfositik lösemi (CLL) içeren, B-hücreli malignitelere sahip olan hastaların büyük çoğunluğu, hastalıklarından dolayı ölecektir. Bu hastaları tedavi etmek için bir yaklaşım, kimerik antijen reseptörlerinin (CAR'ların) ekspresyonu yoluyla, tümör hücreleri üzerinde eksprese edilen hedef antijenler için T hücrelerini genetik olarak modifiye etmektir. CAR'lar, bir insanda lökosit antijeninden-bağımsız bir şekilde hücre yüzeyi antijenlerini tanıması için tasarlanmış antijen reseptörleridir. Bu tipteki hastaları tedavi etmek için, CAR'lar eksprese eden genetik olarak modifiye edilmiş hücreleri kullanma girişimleri, çok sınırlı başarıyı karşılamıştır. Bakınız, örneğin, Brentjens et al., 2010, *Molecular Therapy*, 18:4, 666-668; Morgan et al., 2010, *Molecular Therapy*, published online February 23, 2010, pages 1-9 ve Till et al., 2008, *Blood*, 112:2261-2271.

Çoğu kanserde, tümör-spesifik antijenler henüz iyi tanımlanmamıştır, ancak B hücreli malignitelere, CD19 çekici bir tümör ajanıdır. CD19 ekspresyonu normal ve maligne B hücreleri ile sınırlandırılmıştır (Uckun, et al., *Blood*, 1988, 71:13-29), böylece CD19, CAR'ları güvenli bir şekilde test etmek için yaygın bir şekilde kabul edilebilir bir hedeftir. CAR'lar, bir endojen T-hücresi reseptörüne benzer bir şekilde T-hücresi aktivasyonunu tetikleyebilirken, günümüze kadar bu teknolojinin klinik uygulanmasına büyük bir engel, CAR+ T hücrelerinin in vivo genişlemesi, infüzyondan sonra hücrelerin çabuk kaybolması ve hayal kırıklığına uğratan klinik aktivite ile sınırlandırılmıştır (Jena, et al., *Blood*, 2010, 116:1035-1044; Uckun, et al., *Blood*, 1988, 71:13-29).

20040043401 Numaralı US Patenti Başvurusu Yayını, CD3 zeta-zincirinin intraselüler alanını, bir ko-stimülatör proteinden, örneğin, CD28'ten, bir sinyalleme bölgesini ve bir bağlama elemanını bir tek kimerik türde birleştiren kimerik T hücreleri reseptörlerini tarif eder. Milone et al., 2009, *Molecular Therapy*, 17:8, 1453-1464, CD137 sinyal iletim alanlarını içeren kimerik antijen reseptörleri olan T hücrelerini tarif eder.

Böylelikle, *in vivo* genişleyebilen CAR'lar kullanılarak kanserin tedavisi amacıyla bileşikler ve yöntemler için teknikte acil bir ihtiyaç vardır. Mevcut buluş bu ihtiyaca değinir.

5 BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, bir kimerik antijen reseptörünü (CAR) şifreleyen bir izole edilmiş nükleik asit dizisi sağlar, burada CAR bir antijen bağlama alanı, bir transmembran alanı, bir ko-stimülatör sinyalleme bölgesi ve bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir, burada CD3 zeta sinyalleme alanı, SEQ ID NO: 24'ün amino asit dizisini içerir.

Korumanın istendiği buluş yönleri istemlerde tanımlanan gibidir.

Buluşun bir birinci yönünde, bir CAR eksprese etmesi için genetik olarak modifiye edilmiş bir T hücresi sağlanır, burada CAR, bir insanda kanserin tedavi edilmesine yönelik bir yöntemde kullanılmaya yönelik (a) bir anti-CD19 scFv olan bir antijen bağlama alanı, (b) bir ko-stimülatör 4-1BB sinyalleme bölgesi ve (c) bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir, burada anti-CD19 scFv, SEQ ID NO:20'nin amino asit dizisini içerir ve/veya CD3 zeta sinyalleme alanı, SEQ ID NO:24'ün amino asit dizisini içerir ve insan, en az bir kemoterapötik ajana dirençlidir.

Kanser, bir solid-olmayan tümör, örneğin, bir hematolojik tümör, içerebilir. Kanser, lösemi veya lenfoma olabilir. Lösemi aşağıdakilerden biri olabilir:

- (i) bir akut lösemi veya kronik lösemi veya
- (ii) akut lenfositik lösemi.

Alternatif olarak, kanser aşağıdakilerden biri olabilir:

- (i) pre-B akut lenfositik lösemi (pediatrik endikasyon), erişkin-tip akut lenfositik lösemi, mantle hücreli lenfoma veya difüz büyük B-hücreli lenfoma;
- (ii) Hodgkin-dışı lenfoma;
- (iii) multipl miyelom; veya
- (iv) Hodgkin hastalığı.

Buluşun bu yönünün bir uygulamasında kanser, kronik lenfositik lösemidir.

5 Buluşun bir ikinci yönünde, kanseri tedavi etmek amacıyla, söz konusu T hücrelerini kanser tanısı almış bir insana uygulamayı içeren bir yöntemde kullanılması için, bir CAR eksprese etmesi için genetik olarak mühendislik uygulanmış bir T hücresi sağlanır, burada CAR (a) bir anti-CD19 scFv olan bir antijen bağlama alanı, (b) bir ko-
10 stimülatör 4-1BB sinyalleme bölgesi ve (c) bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir, burada anti-CD19 scFv, SEQ ID NO:20'nin amino asit dizisini içerir ve CD3 zeta sinyalleme alanı, SEQ ID NO:24'ün amino asit dizisini içerir ve söz konusu yöntem insanda uygulamadan sonra en az sekiz ay, dokuz ay, on ay, on bir ay, on iki ay, iki yıl veya üç yıl boyunca kalmaya devam eden genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücrelerinin bir popülasyonunu üretir ve burada insan en az bir kemoterapötik ajana dirençlidir.

15 Genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücrelerinin kalmaya devam eden popülasyonu, insana uygulanmış bir T hücresinden, insana uygulanmış bir T hücresinin bir projesinden ve bunların bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilen en az bir hücre içerebilir. Genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücrelerinin kalmaya devam eden popülasyonu bir hafıza T hücresi içerebilir.

20 Buluşun bir üçüncü yönünde, kanseri tedavi etmek amacıyla, söz konusu T hücrelerini kanser tanısı almış bir insana uygulamayı içeren bir yöntemde kullanılması için, bir CAR eksprese etmesi için genetik olarak mühendislik uygulanmış bir T hücresi sağlanır, burada CAR (a) bir anti-CD19 scFv olan bir antijen bağlama alanı, (b) bir ko-
25 stimülatör 4-1BB sinyalleme bölgesi ve (c) bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir, burada anti-CD19 scFv, SEQ ID NO:20'nin amino asit dizisini içerir veya CD3 zeta sinyalleme alanı, SEQ ID NO:24'ün amino asit dizisini içerir ve söz konusu yöntem insanda genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücrelerinin bir popülasyonunu genişletir ve burada insan en az bir kemoterapötik ajana dirençlidir.

30 İnsandaki projeni T hücreleri, bir hafıza T hücresi içerebilir. Projeni T hücrelerinin popülasyonu, insanda uygulamadan sonra en az üç ay, dört ay, beş ay, altı ay, yedi ay, sekiz ay, dokuz ay, on ay, on bir ay, on iki ay, iki yıl veya üç yıl boyunca kalmaya devam eder.

Buluşun yukarıda tanımlandığı üzere kullanılması için bir T hücresi ile ilgili yönlerinde, kanser birinci yönde tanımlandığı şekilde olabilir veya kanser kronik lenfositik lösemi olabilir.

- 5 Buluşun yukarıda tanımlandığı üzere kullanılması için bir T hücresi ile ilgili yönlerinde, insan, refrakter CD19+ lösemi ve lenfoma olan kronik lenfositik lösemiye sahip olabilir.

10 Buluşun herhangi bir yönünde, T hücresi, bir otolog veya allojeneik hücre olabilir. Hücre, örneğin, CD20 ile reaksiyona giren ajanlar, örn., Rituksan, ile B-hücreli ablatif terapiyi takiben uygulanabilir.

15 Buluşun yukarıda tanımlandığı üzere kullanılması için bir T hücresi ile ilgili yönlerinde, hücre bir farmasötik bileşimde 10^4 ila 10^9 hücre/kg vücut ağırlığı veya 10^5 ila 10^6 hücre/kg vücut ağırlığı olan bir dozajda uygulanabilir.

15 Buluşun bir uygulamasında göre, kullanılması için T hücresi yukarıda tanımlandığı şekilde olabilir, burada:

20 (i) ko-stimülatör 4-1BB sinyalleme bölgesi, SEQ ID NO: 23'ün amino asit dizisini içerir;

(ii) CAR, SEQ ID NO: 12'de izah edilen amino asit dizisini içerir;

(iii) anti-CD19 scFv, SEQ ID NO: 14 ile şifrelenir;

(iv) 4-1BB sinyalleme bölgesi, SEQ ID NO: 17 ile şifrelenebilir ve CD3 zeta sinyalleme alanı, SEQ ID NO: 18 ile şifrelenir;

25 (v) anti-CD19 scFv, SEQ ID NO: 14 ile şifrelenir, 4-1BB sinyalleme bölgesi, SEQ ID NO: 17 ile şifrelenir ve CD3 zeta sinyalleme alanı, SEQ ID NO: 18 ile şifrelenir; veya

(vi) CAR, SEQ ID NO: 8'de izah edilen nükleik asit dizisi ile şifrelenir.

30 SEQ ID NO: 12'nin amino asit dizisini içeren bir CAR şifreleyen bir nükleik asit dizisi de burada açıklanır.

SEQ ID NO: 8'in amino asit dizisini içeren bir CAR şifreleyen bir nükleik asit dizisi de burada açıklanır.

SEQ ID NO: 18'in nükleik asit dizisi ile şifrelenen CAR içindeki bir CD3 zeta sinyalleme alanı da burada açıklanır

5 Bir antijen bağlama alanı, bir transmembran alanı, bir ko-stimülatör sinyalleme bölgesi ve bir CD3 zeta sinyalleme alanı içeren bir izole edilmiş CAR da burada açıklanır, burada CD3 zeta sinyalleme alanı, SEQ ID NO: 24'ün amino asit dizisini içerir.

10 Bir CAR şifreleyen bir nükleik asit dizisi içeren bir hücre de burada açıklanır, burada CAR, bir antijen bağlama alanı, bir transmembran alanı, bir ko-stimülatör sinyalleme bölgesi ve SEQ ID NO: 24'ün amino asit dizisini içeren bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir.

15 Burada açıklandığı üzere, CAR içeren hücre, CAR'ın antijen bağlama alanı bunun karşılık gelen antijenini bağladığında, bir anti-tümör immünite gösterir.

20 Bir CAR şifreleyen bir nükleik asit dizisi içeren bir vektör de burada açıklanır, burada CAR, bir antijen bağlama alanı, bir ko-stimülatör sinyalleme bölgesi ve bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir, burada CD3 zeta sinyalleme alanı, SEQ ID NO: 24'ün amino asit dizisini içerir.

25 Burada bir memelide bir hedef hücre popülasyonu veya dokusu için bir T hücresi-aracılı immün yanıtı stimüle etmek amacıyla bir yöntem de açıklanır. Bir uygulamada yöntem, bir memeliye bir CAR eksprese etmesi için genetik olarak modifiye edilmiş bir hücrenin etkili bir miktarını uygulamayı içerir, burada CAR bir antijen bağlama alanı, bir ko-stimülatör sinyalleme bölgesi ve SEQ ID NO: 24'ün amino asit dizisini içeren bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir, burada antijen bağlama alanı, hedef hücre popülasyonunu veya dokuyu spesifik olarak tanıması için seçilir.

30 Bir memelide bir anti-tümör immünite sağlamanın bir yöntemi de açıklanır. Bir memeliye bir CAR eksprese etmesi için genetik olarak modifiye edilmiş bir hücrenin etkili bir miktarını uygulamayı, böylece memelide bir anti-tümör immünite sağlamayı, içeren bir yöntem de açıklanır, burada CAR bir antijen bağlama alanı, bir ko-stimülatör sinyalleme bölgesi ve SEQ ID NO: 24'ün amino asit dizisini içeren bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir,

35

Bir tümör antijeninin artmış bir ekspresyonu ile ilişkili olan bir hastalığa, bozukluğa veya rahatsızlığa sahip olan bir memeliyi tedavi etmenin bir yöntemi de açıklanır. Bir memeliye bir CAR eksprese etmesi için genetik olarak modifiye edilmiş bir hücrenin etkili bir miktarını uygulamayı, böylece memeliyi tedavi etmeyi, içeren bir yöntem de açıklanır, burada CAR bir antijen bağlama alanı, bir ko-stimülatör sinyalleme bölgesi ve SEQ ID NO: 24'ün amino asit dizisini içeren bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir.

Burada açıklandığı üzere hücre, bir otolog T hücresidir.

10 Burada tarif edildiği üzere, tümör antijenleri, CD19, CD20, CD22, ROR1, mezotelin, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glikolipit F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR ve bunların herhangi bir kombinasyonunu içerir.

Kronik lenfositik lösemiye olan bir insanı tedavi etmenin bir yöntemi de burada açıklanır. Bir uygulamada, yöntem bir insana bir CAR eksprese etmesi için genetik olarak mühendislik uygulanmış bir T hücresi uygulamayı içerir, burada CAR bir antijen bağlama alanı, bir ko-stimülatör sinyalleme bölgesi ve SEQ ID NO: 24'ün amino asit dizisini içeren bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir.

20 Burada tarif edildiği üzere, insan en az bir kemoterapötik ajana dirençlidir.

Burada tarif edildiği üzere, kronik lenfositik lösemi refrakter CD19+ lösemidir veya lenfomadır.

25 Kanser tanısı almış bir insanda genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücrelerinin kalmaya devam eden bir popülasyonunu üretmenin bir yöntemi de burada açıklanır. Bir insana bir CAR eksprese etmesi için genetik olarak mühendislik uygulanmış bir T hücresini uygulamayı içeren bir yöntem de burada tarif edilir, burada CAR bir antijen bağlama alanı, bir ko-stimülatör sinyalleme bölgesi ve SEQ ID NO: 24'ün amino asit dizisini içeren bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir, burada genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücrelerinin kalmaya devam eden popülasyonu, insan içinde uygulamadan sonra en az bir ay boyunca kalmaya devam eder.

Burada tarif edildiği üzere, genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücrelerinin kalmaya devam eden bir popülasyonu, insana uygulanmış bir T hücresinden, insana

uygulanmış bir T hücrelerinin bir projesinden ve bunların bir kombinasyonundan oluşan gruptan seçilen en az bir hücre içerir.

5 Burada tarif edildiği üzere, genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücrelerinin kalmaya devam eden popülasyonu, bir hafıza T hücresi içerir.

10 Burada tarif edildiği üzere, genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücrelerinin kalmaya devam eden popülasyonu, insan içinde uygulamadan sonra en az üç ay boyunca kalmaya devam eder. Burada tarif edildiği üzere, genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücrelerinin kalmaya devam eden popülasyonu, insan içinde uygulamadan sonra en az dört ay, beş ay, altı ay, yedi ay, sekiz ay, dokuz ay, on ay, on bir ay, on iki ay, iki yıl veya üç yıl boyunca kalmaya devam eder.

15 Burada tarif edildiği üzere, kronik lenfositik lösemi tedavi edilir.

20 Kanseri tanınmış bir insanda genetik olarak mühendislik uygulanmış bir popülasyonu genişletmenin bir yöntemi de burada açıklanır. Bir insana bir CAR ekspresyonu için genetik olarak mühendislik uygulanmış bir T hücrelerini uygulamayı içeren bir yöntem de burada tarif edilir, burada CAR bir antijen bağlama alanı, bir ko-stimülatör sinyalleme bölgesi ve SEQ ID NO: 24'ün amino asit dizisini içeren bir CD3 zeta sinyalleme alanı içerir, burada uygulanmış genetik olarak mühendislik uygulanmış T hücresi, insanda projesini T hücrelerinin bir popülasyonunu üretir.

25 Burada tarif edildiği üzere, insandaki projesini T hücreleri, bir hafıza T hücresi içerir.

Burada tarif edildiği üzere, T hücresi bir otolog T hücresidir.

Burada tarif edildiği üzere, insan, en az bir kemoterapötik ajana dirençlidir.

30 Burada tarif edildiği üzere, kanser, kronik lenfositik lösemidir. Bir başka uygulamada, kronik lenfositik lösemi, refrakter CD19+ lösemidir ve lenfomadır.

35 Burada tarif edildiği üzere, projesini T hücrelerinin popülasyonu insan içinde uygulamadan sonra en az üç ay boyunca kalmaya devam eder. Burada tarif edildiği üzere, projesini T hücrelerinin popülasyonu insan içinde uygulamadan sonra en az dört

ay, beş ay, alt ay, yedi ay, sekiz ay, dokuz ay, on ay, on bir ay, on iki ay, iki yıl veya üç yıl boyunca kalmaya devam eder.

Burada tarif edildiği üzere, kanser tedavi edilir.

5

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Buluşun tercih edilen uygulamalarının aşağıdaki detaylı açıklaması, ekli şekiller ile bağlantılı olarak okunduğunda daha iyi anlaşılacaktır. Buluşu açıklama amacıyla, şimdilik tercih edilen uygulamalar şekillerde gösterilir. Buna rağmen, buluşun şekillerde gösterilen kesin düzenlemeler ve işe yararlılıklar ile sınırlandırılmadığı anlaşılmalıdır.

Şekil 1, Şekiller 1A ila 1C'yi içerir, gen-transfer vektörünün ve transgeninin, gen modifiye edilmiş T hücresi üretiminin ve klinik protokol tasarımının şematik temsillerinin bir seri görüntüsüdür. Şekil 1A, majör fonksiyonel elemanlar gösteren lentiviral vektörleri ve transgeni gösterir. FMC63 mürin monoklonal antikorundan türetilen anti-CD19 scFv'nin, insan CD8 α menteşe ve transmembran alanının ve insan 4-1BB ve CD3 zeta sinyalleme bölgelerinin ekspresyonunu yönlendiren bir veziküler stomatit virüsü protein G psödotiplenmiş klinik gradlı lentiviral vektör (pELP'ler olarak gösterilir, 19BBz) üretilmiştir. Transgenin konstitütif ekspresyonu, bir EF-1 α (elongasyon faktörü-1 α promotörü); LTR, uzun uç tekrarı; RRE, rev yanıt elemanı, (cPPT) ve santral sonlandırma dizisi (CTS) dâhil edilmesi ile yönlendirilmiştir. Şekil, ölçeksizdir. Şekil 1B, T hücresi üretilmesini gösterir. Ototolog hücreler bir aferez vasıtasıyla elde edilmiştir ve T hücreleri mononükleer hücre yıkayarak ayırma ile zenginleştirilmiştir, yıkanmıştır ve rezidüel lösemi hücreleri, T hücrelerinin pozitif seleksiyonu ve aktivasyonu için anti-CD3/CD28 kaplı para-manyetik bilyelerin eklenmesi ile tüketilmiştir. Lentiviral vektör, hücre aktivasyonu zamanında eklenmiştir ve kültür başlatılmasından sonra gün 3'te artırılmıştır. Hücreler bir sallanan platform cihazı (WAVE Bioreactor System) üzerinde 8-12 gün boyunca genişletilmiştir. Kültürün nihai gününde, bilyeler bir manyetik alandan geçirme ile uzaklaştırılmıştır ve CART19 T hücreleri hasat edilmiştir ve infüze edilebilir vasat içinde dondurarak-saklanmıştır. Şekil 1C, klinik protokol tasarımını gösterir. Hastalara, tarif edildiği üzere lenfo-tüketici kemoterapi verilmiştir, bunu 15-20 dakikalık bir periyot boyunca i.v. yerçekimi-akışlı damla ile CART

infüzyon #1 izlemiştir. İnfüzyon, kemoterapinin tamamlanmasından 1 ila 5 günde sonra başlayan 3 gün boyunca (%10, %30, %60) bir yarı doz yaklaşımı kullanılarak verilmiştir. Sonlanım-noktası analizleri, çalışma haftası 4'te yapılmıştır. Aktif görüntülemenin sonunda, süjeler FDA kılavuzu yarıncı uzun süreli takip için bir destinasyon protokolüne transfer edilmiştir.

5

Şekil 2, Şekiller 2A ila 2F'yi içerir, CART19 kan ve ilik hücrelerinin sürdürülmüş *in vivo* genişlemesini ve devamlılığını gösteren bir seri görüntüdür. Şekil 2A ila 2C'de gösterildiği üzere tam kandan veya Şekil 2D ila 2F'de gösterildiği üzere ilikten izole edilen DNA, Şekil 2A'da ve 2D'de gösterildiği üzere UPN 01'den, Şekil 2B'de ve 2E'de gösterildiği üzere UPN 02'den ve Şekil 2C ve 2F'de gösterildiği üzere UPN 03'ten elde edilen örnekler, CART19 dizilerini saptamak ve kantifiye etmek için kalifiye bir analiz kullanılarak yığın içinde Q-PCR analizine tabi tutulmuştur. Her bir veri noktası, %1,56'dan daha az maksimal CV %'si ile, 100-200 ng genomik DNA üzerinde üç kopya hâlindeki ölçümlerin ortalamasını temsil eder. Analiz için, geçme/kalma parametreleri, amplifikasyonun eğimi ve etkililiği için önceden-belirlenmiş aralıkları ve bir referans örneğin amplifikasyonunu içermiştir. Analiz için standart eğri aralığı ile belirlenmiş kantifikasyon alt sınırı, 2 kopya transgen/mikrogram genomik DNA'dır; bu sayının altındaki örnek değerler tahminler olarak düşünülür ve tekrarların en az 2/3'si değerler için %15'lik CV'si olan bir Ct değeri ürettiğinde, sunulur. CART19 hücreleri, UPN 01 ve UPN 03 için gün 0'da, 1'de ve 2'de ve UPN 02 için günler 0'da, 1'de, 2'de ve 11'de infüze edilir.

10

15

20

Şekil 3, Şekiller 3A ila 3D'yi içerir, CAR T hücresi infüzyonundan önce ve sonra serum ve kemik iliği sitokinlerini; CART19 hücre infüzyonundan sonra gösterilen günde, Şekil 3A'da gösterildiği üzere, UPN 01'de, Şekil 3B'de gösterildiği üzere UPN 02'de ve Şekil 3C'de gösterildiği üzere UPN 03'te, serum sitokinlerinde, kemokinlerde ve sitokin reseptörlerinde değişimlerin boylamsal ölçümlerini ve Şekil 3D'de gösterildiği üzere UPN 03'ten elde edilen kemik iliğinde aynı analitlerin seri değerlendirmelerini gösteren bir seri görüntüdür. Örnekler, Luminex bilye dizilim teknolojisi ve önceden-toplanmış ve doğrulanmış çoğul kitler kullanılarak çoğul analizi tabi tutulmuştur. ≥ 3 'lük bir kat değişimi olan analitler gösterilir ve Şekil 3A ila 3C'de gösterildiği üzere baseline'dan bağıl değişim olarak veya Şekil 3D'de gösterildiği üzere mutlak değerler olarak grafik hâline getirilir. Her bir zaman-noktasında her bir analit için mutlak değerler, standart eğriler için %80-120 gözlenen/beklenen kesim değerleri ile belirlenmiş

25

30

35

üst ve alt kantifikasyon sınırları (ULOQ, LLOQ) ile, 3-katlık 8-puanlık bir seyreltme serileri boyunca bir rekombinant protein-temelli standart eğriden türetilmiştir. Her bir örnek, hesaplanan ortalama değerleri ve çoğu durumda %10'dan az CV %'si olan iki-kopya hâlinde değerlendirilmiştir. Mutlak değerler için geniş aralık bağlamında birleştirilmiş veri sunumunu bağdaştırmak için, veriler her bir analit için baseline değeri boyunca kat-değişimi olarak sunulur. Baseline değerlerinin saptanabilir olmadığı durumlarda, en düşük standart eğri değerinin yarısı, baseline değer olarak kullanılmıştır. Analitler için standart eğri aralıkları ve baseline (gün 0) değerleri (UPN01, 02 ve 03 için parantez içinde sıralı olarak listelenmiştir), tümü pg/ml cinsindedir: IL1-R α : 35.5-29,318 (689, 301, 287); IL-6: 2.7-4,572 (7, 10.1, 8.7); IFN- γ : 11.2-23,972 (2.8, ND, 4.2); CXCL10: 2.1-5,319 (481, 115, 287); MIP-1 β : 3.3-7,233 (99.7, 371, 174); MCP-1: 4.8-3,600 (403, 560, 828); CXCL9: 48.2-3,700 (1,412, 126, 177); IL2-R α : 13.4-34,210 (4,319, 9,477, 610); IL-8: 2.4-5,278 (15.3, 14.5, 14.6); IL-10: 6.7-13,874 (8.5, 5.4, 0.7); MIP-1 α : 7.1-13,778 (57.6, 57.3, 48.1).

Şekil 4, Şekiller 4A ila 4D'yi içerir, uzatılmış yüzey CART19 ekspresyonunu ve fonksiyonel hafıza CAR'larının *in vivo* oluşturulmasını gösteren bir seri görüntüdür. Şekil 4A, periferde ve ilikte CAR-eksprese eden CD3+ lenfositlerinin saptanmasını ve B hücrelerinin yokluğunu gösterir. CART19 hücresi infüzyonundan sonra gün 169'da UPN 03'ten elde edilen yeni işlenmiş periferik kan ve ilik mononükleer hücreleri CAR19'un yüzey ekspresyonu (üstte) veya B hücrelerinin varlığı (altta) için akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir; bir kontrol olarak, bir sağlıklı donör ND365'ten elde edilen PBMC boyanmıştır. CD3+ ve B hücresi popülasyonları için kapılama stratejisi, Şekil 9'da sunulur. CD3+ lenfositlerinde CAR19 ekspresyonunu değerlendirmek için, örnekler, CD14-PE-Cy7 ve CD16-PE-Cy7 (boşaltma kanalı) için antikolar ve, CD3+ üzerinde pozitif olarak kapılanmış, CD3-FITC ile boyanmıştır ve Alexa-647'ye konjugat CD8a-PE ve anti-CAR19 idiyotip antikor ile birlikte-boyama ile CD8+ ve CD8-lenfosit kompartımanları içinde CAR19 ekspresyonu için değerlendirilmiştir. Eğrilerdeki veriler boşaltma kanalı-negatif/CD3-pozitif hücre popülasyonu üzerinde kapılanır. B hücrelerinin varlığını değerlendirmek için, örnekler CD14-APC ve CD3-FITC için antikolar (boşaltma kanalları) ile birlikte-boyanmıştır ve CD20-PE ve CD19-PE-Cy-7 için antikolar ile birlikte-boyama ile boşaltma kanalı-negatif fraksiyonunda B hücrelerinin varlığı için değerlendirilmiştir. Tüm olgularda, negatif kapı kadrantları Şekiller 4B'de 4C'de gösterildiği üzere

boyama-olmayan kontroller üzerinde oluşturulmuştur. CD4+ (Şekil 4B) ve CD8+ (Şekil 4C) T hücre alt-kümelerinin T hücresi immüno-fenotiplemesi gösterilir. T hücresi infüzyonundan sonra gün 56'da ve 169'da UPN 03'ten aferez ile elde edilmiş dondurulmuş periferik kan örnekleri, eklenmiş faktörler bulunmayan kültür vasatı içinde gece boyu dinlendirilmiştir, yıkanmıştır ve T hücresi hafızasının, aktivasyonunun ve tüketilmesinin belirteçlerinin ekspresyonu için çoklu-parametrik immüno-fenotiplemeye tabi tutulmuştur. Şekil 8'de gösterildiği üzere, kapılama stratejisi boşaltma kanalı (CD14, CD16, Live/Dead Aqua)-negatif ve CD3-pozitif hücreleri üzerindeki bir başlangıç kapılaması, akabinde CD4+ ve CD8+ hücreleri üzerinde pozitif kapılar içermiştir. Kapılar ve kadranlar, FMO kontrolleri (CAR, CD45RA, PD-1, CD25, CD127, CCR7) kullanılarak ve pozitif hücre popülasyonları (CD3, CD4, CD8) ve berrak bir şekilde çizilmiş alt-kümeler (CD27, CD28, CD57) ile oluşturulmuştur; veriler olayların objektif görselleştirilmesi için bi-üssel transformasyondan sonra gösterilmiştir. Şekil 4D, kalmaya devam eden CAR hücrelerinin fonksiyonel kompetansını gösterir. T hücresi infüzyonundan sonra gün 56'da ve 169'da UPN 03'ten aferez ile elde edilmiş dondurulmuş periferik kan örnekleri, eklenmiş faktörler bulunmayan kültür vasatı içinde gece boyu dinlendirilmiştir, yıkanmıştır ve CD107 degranülasyon analizleri kullanılarak CD19-eksprese eden hedef hücreleri tanıma yetisi için *ex-vivo* doğrudan değerlendirilmiştir. Anti-CD28, anti-CD49d ve CD107-FITC varlığında bir iki-saatlik inkübasyonu takiben, hücre karışımları hasat edilmiştir, yıkanmıştır ve CART19 hücrelerinin CD19-eksprese eden hedeflere yanıtta de-granüle etme yetisini değerlendirmek için çoklu-parametrik akış sitometrik analize tabi tutulmuştur. Kapılama stratejisi, boşaltma kanalları (CD14-PE-Cy7, CD16-PE-Cy7, Live/Dead Aqua)-negatif ve CD3-PE-pozitif hücreler üzerinde bir başlangıç kapısı, akabinde CD8-PE-Tektaş Kırmızı-pozitif hücrelerde kapılama içermiştir; sunulan veriler, CD8+ kapılanmış popülasyon içindir. Tüm olgularda, negatif kapı kadranları, boyama-olmayan kontroller üzerinde oluşturulmuştur.

Şekil 5, Şekiller 5A ila 5C'yi içerir, CART19 hücrelerinin infüzyonundan sonra klinik yanıtları değerlendiren deneylerin sonuçlarını gösteren bir seri görüntüdür. Şekil 5A, UPN 02'nin, rituksimabın ve bendamustinin iki siklusu ile minimal yanıt ile muamele edildiğini gösterir (R/B, ok). Rituksimab ve bendamustin-dirençli lösemi, infüzyonun 18 günü içinde mutlak lenfosit sayısında (ALC) 60,600/µl'den 200/µl'ye bir düşüş ile gösterildiği üzere, kandan çabucak

temizlenmiştir. Kortikosteroid tedavisi, malezden ve non-enfeksiyöz febril sendromundan dolayı infüzyondan sonra gün 18'de başlatılmıştır. Referans çizgi (kesikli çizgi), ALC için normalin üst sınırını gösterir. Şekil 5B, hasta UPN 01'den ve 03'ten elde edilen sırayla kemik iliği biyopsisi veya pıhtı numunelerini CD20 için boyayan örnek deneylerin sonuçlarını gösterir. Her iki hastada bulunan lösemi ile tedavi-öncesi infiltrasyonu, hücreliliğin ve üç-soy hematopoiezin normalizasyonu ile eşlik edilen tedavi sonrası numuneler üzerinde yoktur. UPN 01, akış sitometrisi, sitogenetik ve flüoresans in-situ hibridizasyon ile değerlendirildiği üzere saptanmış herhangi bir CLL hücrelerine veya kemik iliğinde veya kanda akış sitometrisi ile saptanan normal B hücrelerine sahip değildir. UPN 03, ayrıca bunların poliklonal olduğunu da gösteren, gün +23'te akış sitometrisi ile doğrulanmış %5 rezidüel normal CD5-negatif B hücrelerine sahiptir; gün +176'da normal B hücreleri saptanmamıştır. Şekil 5C, kemoterapi-dirençli jeneralize lenfadenopatinin çabuk çözülmesini değerlendirmek için sıralı BT görüntüleme kullanılan deneylerin sonuçlarını gösterir. Oklar ve daire ile gösterildiği üzere, bilateral aksiler kitleler. infüzyondan sonra 83 (UPN 01) ve 31 (UPN 03) günde çözülmüştür.

Şekil 6, Şekiller 6A ila 6C'yi içerir, UPN 01, 02, 03 için dolaşımdaki mutlak lenfosit sayılarını ve toplam CART19+ hücrelerini gösteren bir seri görüntüdür. Dolaşımdaki toplam CART19+ hücrelerine karşı lenfositlerin toplam sayısı (toplam normal ve CLL hücreleri), CBC değerlerinden elde edilen mutlak lenfosit sayısı kullanılarak ve 5,0 L'lik bir kan hacmi varsayarak tüm 3 süje için grafik hâline getirilir. Dolaşımdaki CART19 hücrelerinin toplam sayısı, Şekil 2'de gösterildiği üzere mutlak lenfosit sayıları olan tandem CBC değerleri ve Q-PCR işaretleme değerleri kullanma, burada başka yerde tarif edildiği üzere kopya/ μ g DNA'yı ortalama işaretleme %'sine dönüştürme ile hesaplanmıştır. Q-PCR işaretleme %'sinin infüzyon ürünlerinin sitometrik karakterizasyonu ile ve eş-zamanlı akış sitometrisi verilerinin boyama ile CART19 hücrelerini doğrudan saymak için mevcut olduğu örneklerden veriler ile yakından korele olduğu (<2 katlık varyasyon) bulunmuştur.

Şekil 7, Şekiller 7A ila 7D'yi içerir, T hücresi infüzyonundan 71 gün sonra UPN-01 PBMC'de CART19-pozitif hücrelerin doğrudan *ex vivo* saptanmasını içeren deneyleri gösteren bir seri görüntüdür. Infüzyondan sonra gün 71'de aferez sonrası yeni toplanmış veya T hücresi ürününün üretilmesi için aferez zamanında (baseline) dondurulmuş ve boyamadan önce uygulanabilir bir

şekilde buzu çözülen UPN-01 PBMC, yüzeyi üzerinde CAR19 kısmı eksprese eden CART19 hücrelerinin varlığını saptamak için akış-sitometrik analize tabi tutulmuştur. Lenfosit içinde CAR19 ekspresyonunu değerlendirmek için, örnekler Alexa-647'ye konjugat CD3-PE ve anti-CAR19 idiyotip antikor ile birlikte boyanmıştır veya tek başına CD3-PE (CAR19 için FMO) ile birlikte boyanmıştır. Şekil 7A, bir başlangıç lenfosit kapısının, ileri ve yan saçılma (SSC'ye kıyasla FSC) göre, akabinde CD3+ hücreleri üzerinde kapılama ile oluşturulduğunu gösterir. Şekil 7B, CD3+ lenfosit kapısını gösterir; Şekil 7C, CAR idiyotip boyamayı gösterir; Şekil 7D, CAR idiyotip FOM'yu gösterir. CAR19-pozitif kapı, CAR19 FMO örnekleri üzerinde oluşturulmuştur.

Şekil 8, Şekiller 8A ila 8C'yi içerir, UPN 03 kan numunelerinde poli-kromatik akış sitometrisi kullanılması ile CART19 ekspresyonunu tanımlamak için kapılama stratejisini gösteren bir seri görüntüdür. Şekil 8C için kapılama stratejisinin, UPN 03 Gün 56 örneği için gösterilir ve UPN 03 Gün 169 örneği üzerinde kullanılan stratejini temsilidir. Şekil 8A, primer kapıyı gösterir: Boşaltma (CD14, CD16, Live/Dead Aqua) negatif, CD3-pozitif. Şekil 8B, sekonder kapıları gösterir: CD4-pozitif, CD8-pozitif. Şekil 8C, tersiyer kapıları gösterir: CAR FMO örnekleri üzerinde oluşturulmuş CAR19-pozitif ve CAR19-negatif (en-sağ paneller).

Şekil 9, kan ve ilik numuneleri içinde CART19 ekspresyonunu ve B hücrelerini doğrudan tanımlamak için kapılama stratejisini gösterir. CAR-eksprese eden CD3+ lenfositlerinin saptanmasını ve periferde ve ilikte B hücrelerinin yokluğunu gösteren, Şekil 4A için kapılama stratejisi: Sol grafik: Hücre kapısı; Üst panel: CD3+ hücreleri için pozitif kapı, Alt panel: B hücreleri için negatif kapı (CD14-negatif, CD3-negatif). NC365, bir sağlıklı donörden periferik kan kontrol hücreleri.

Şekil 10, hasta demografiğini ve yanıtını özetleyen bir görüntüdür.

Şekil 11, CART-19 hücrelerinin üretme prosesini gösterir.

Şekil 12, Şekiller 12A ila 12D'yi gösterir, bir hastada klinik yanıtı gösteren bir seri görüntüdür. Şekil 12A, hastadan elde edilen T hücrelerini enfekte etmek için kullanılan lentiviral vektörü gösterir. FMC63 mürin monoklonal antikordan türetilen anti-CD19 scFv'nin, insan CD8α menteşe ve transmembran alanının ve insan 4-1BB ve CD3ζ sinyalleme alanlarının ekspresyonunu yönlendiren veziküler stomatit virüsü proteini G'nin bir psödo-tiplenmiş, klinik-gradlı lentiviral vektörü (pELP'ler, 19-BB-z) üretilmiştir. Şekil 12A'nın altında, CAR19

transgeninin detayları, majör fonksiyonel elemanları gösterir. Şekil ölçeksizdir. 3'LTR, 3' uzun uç tekrarını gösterir; 5'LTR, 5' uzun uç tekrarını gösterir; Amp R, amfisilin direnç geni; Bovin GH Poli A, poliadenilasyon kuyruğu olan bovin büyüme hormonu; cPPT/CTS, santral sonlandırma dizisi bulunan santral polipürin izi; EF-1 α , elongasyon faktörü 1-alfa; env, zarf; gag, grup-spesifik antijen; pol, polimerazı ve ters transkriptazı şifreleyen HIV geni; R, tekrar; RRE, rev yanıt elemanı; scFv, tek-zincirli değişken fragmanı; TM, transmembran, ve WPRE, dağ sıçanı hepatit virüsü post-translasyonel regülatör elemanı. Şekil 12B, birinci CART19-hücre infüzyonundan sonra gün 1 ila gün 28 arasında serum kreatinin, ürik asit ve laktat dehidrojenaz (LDH) düzeylerini gösterir. Pik değerleri, tümör lizis sendromu için hastaneye yatış ile kesişmiştir. Şekil 12C, kemoterapiden 3 gün sonra (gün -1, CART19-hücre infüzyonundan önce) ve CART19-hücre infüzyonundan 23 gün ve 6 ay sonra (hematoksin ve eozin) elde edilen ilik-biyopsisi numunelerini gösterir. Baseline numunesi, toplam hücreliliğin %40'ını oluşturan küçük, matür lenfositlerin ağırlıklı olarak interstisyel agregatları ile infiltre edilmiş, üç-soy hematopoiezi olan hiperhücreli kemik iliğini (%60) gösterir. Gün 23'te elde edilen numune, bir T hücresi ve CD5-negatif B hücrelerinin karışımı ile birlikte, kronik lenfoid lösemi (CLL) için negatif olan, rezidüel lenfoid agregatları (%10) gösterir. İnfüzyondan 6 ay sonra elde edilen numune, lenfoid agregatlar olmadan, üç-soy hematopoiez gösterir ve CLL'nin yokluğu devam etmiştir. Şekil 12D, hasta çalışmaya kaydedilmeden önce ve birinci infüzyondan 31 gün ve 104 gün sonra, elde edilen kontrast-güçlendirilmiş BT taramalarını gösterir. İnfüzyon-öncesi BT taramaları, 1- ila 3-cm'lik bilateral kitleleri ortaya çıkarır. Aksiler lenfadenopatinin regresyonu infüzyondan sonra 1 ay içinde gerçekleşmiştir ve sürdürülmüştür. Oklar, terapiden önce çeşitli genişletilmiş lenf nodlarını ve terapiden sonra karşılaştırılabilir BT taramaları üzerindeki lenf-nodu yanıtlarını vurgular.

Şekil 13, Şekiller 13A ila 13E'yi içerir, kimerik antijen reseptörü T-hücresi infüzyonundan önce ve sonra serum ve kemik iliği sitokinlerini gösteren bir seri görüntüdür. Sitokin interferon- γ 'nın (Şekil 13A), interferon- γ -stimüle edilmiş kemokinler C-X-C motifi kemokin 10'un (CXCL10) (Şekil 13B) ve C-X-C motifi ligand 9'un (CXCL9) (Şekil 13C) ve interlökin-6'nın (Şekil 13D) seri ölçümleri gösterilen zaman noktalarında ölçülmüştür. Bu enflamatuvar sitokinlerdeki ve kemokinlerdeki artışlar tümör lizis sendromunun başlaması ile kesişmiştir.

İnterlökin-6'nın düşük düzeyleri, baseline'da saptanmışken, interferon- γ , CXCL9 ve CXCL10'un baseline'da saptama sınırlarının altındadır. Hastada analitler ve baseline değerler için, parantezler içinde verilen, standart-eğri aralıkları aşağıda olduğu şekildedir: interferon- γ , 11,2 ila 23.972 pg/mili-litre (1,4 pg pg/mili-litre);
 5 CXCL10, 2,1 ila 5319 pg/mili-litre (274 pg/mili-litre); CXCL9, 48,2 ila 3700 pg/mili-litre (177 pg/mili-litre); interlökin-6, 2,7 ila 4572 pg/mili-litre (8,3 pg/mili-litre); tümör nekroz faktörü α (TNF- α), 1,9 ila 4005 pg/mili-litre (saptanamaz); ve çözünebilir interlökin-2 reseptörü, 13,4 ila 34.210 pg/mili-litre (644 pg/mili-litre). Şekil 13E, kemik iliği içinde immün yanıtın indüksiyonunu gösterir. Sitokinler
 10 TNF- α , interlökin-6, interferon- γ , kemokin CXCL9 ve çözünebilir interlökin-2 reseptörü, CART19-hücre infüzyonundan önce ve sonra gösterilen günlerde kemik iliği aspiratlarından elde edilen süpernatant akışkanları içinde ölçülmüştür. İnterlökin-6, interferon- γ , CXCL9 ve çözünebilir interlökin-2 reseptörü düzeylerindeki artışlar, tümör lizis sendromu, pik kimerik antijen
 15 reseptörü T-hücresi infiltrasyonu ve lösemik infiltratın eradikasyonu ile ilişkilidir.

Şekil 14, Şekiller 14A ila 14C'yi içerir, kimerik antijen reseptörü T hücrelerinin *in vivo* genişlemesini ve devamlılığını gösteren bir seri görüntüdür. Genomik DNA (gDNA), kimerik antijen reseptörü T-hücresi infüzyonundan önce ve sonra seri
 20 zaman noktalarında toplanan ve kantitatif gerçek-zamanlı polimeraz-zincir-reaksiyonu (PCR) analizi için kullanılan hastanın tam kanının (Şekil 14A) ve kemik iliği aspiratlarının (Şekil 14B) örneklerinden izole edilmiştir. Transgenik DNA ve CAR19 eksprese eden lenfositlerin yüzdesi temelinde değerlendirildiği üzere, kimerik antijen reseptörü T hücreleri periferik kanda ve kemik iliğinde
 25 başlangıç yamanma düzeylerinden 1000 kattan daha fazla yüksek olan düzeylere genişlemiştir. Kimerik antijen reseptörü T hücrelerinin pik değerleri, tümör lizis sendromu ile geçici olarak kolere edilmiştir. Gün 0'da elde edilmiş bir kan örneği ve gün 1'de elde edilen bir kemik iliği örneği, baseline'da PCR sinyaline sahip değildir. Başlangıçtaki kemik iliği aspiratlarının akış-sitometrik analizi (Şekil 14C), bir T hücresi azlığı ile, immüno globülin kappa hafif-zincir boyama vasıtasıyla değerlendirildiği üzere, klonal olan CD19+CD5+ hücreleri ile baskın infiltrasyonu gösterir. İnfüzyondan sonra gün 31'de, CD5+ T hücreleri mevcuttur ve normal veya maligne B hücreleri saptanmamıştır. Sayılar, her bir
 30 kadrandaki hücrelerin bağıl sıklığını gösterir. Hem x ekseni hem de y ekseni, bir log₁₀ ölçeği gösterir. Kapılama stratejisi, soldaki kutular içinde CD19+ ve CD5+

hücreleri üzerinde bir başlangıç kapılaması ve CD19+Cd5+ alt-kümesi üzerinde (sağdaki kutular) immünoglobülin kappa ve lamda ekspresyonunun müteakip tanımlanmasını içermiştir.

5 DETAYLI AÇIKLAMA

Buluş, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, hematolojik maligniteleri ve solid tümörleri içeren kanseri tedavi etmek için bileşimler ile ilgilidir. Mevcut buluş, bir kimerik antijen reseptörü (CAR) eksprese etmesi için aktarılmış T hücrelerinin adoptif hücre transferinin bir stratejisi ile ilgilidir. CAR'lar, arzu edilen bir antijen (örn., tümör antijeni) için antikör-temelli özgülüğü bir spesifik anti-tümör hücrel immün aktivitesini gösteren bir kimerik protein üretmek için bir T hücresi reseptörünü-aktive eden intraselüler alan ile birleştiren moleküllerdir.

Mevcut buluş genel olarak, istemlerde tanımlandığı üzere arzu edilen bir CAR'ı kararlı bir şekilde eksprese etmesi için genetik olarak modifiye edilmiş T hücrelerinin kullanılması ile ilgilidir. Bir CAR eksprese eden T hücreleri, burada CAR T hücreleri veya CAR modifiye edilmiş T hücreleri olarak ifade edilir. Tercihen, hücre, MHC'den bağımsız olan yeni antijen özgülüğü sağlayarak, bunun yüzeyi üzerinde bir antikör bağlama alanını kararlı bir şekilde eksprese etmesi için genetik olarak modifiye edilebilir. T hücresi, spesifik bir antikörün bir antijen tanıma alanını CD3-zeta zinciri proteininin bir intraselüler alanı ile bir tek kimerik protein içinde birleştiren bir CAR'ı kararlı bir şekilde eksprese etmesi için genetik olarak modifiye edilir.

Burada tarif edildiği üzere, burada tarif edilen CAR, bir antijen tanıma alanına, bir transmembran alanına ve bir sitoplazmik alana sahip olan bir ekstraselüler alan içerir. Burada tarif edildiği üzere, CAR içindeki alanların biri ile doğal olarak ilişkili olan transmembran alan kullanılır. Burada tarif edildiği üzere ayrıca, transmembran alan, reseptör kompleksinin diğer üyeleri ile etkileşimleri minimuma indirmek amacıyla bu tarz alanların aynı veya farklı yüzey membran proteinlerinin transmembran alanlarını bağlamasını önlemek için seçilebilir veya amino asit sübstütüsyon ile modifiye edilebilir. Tercihen, transmembran alan, CD8 α menteşe alanıdır.

Sitoplazmik alana gelince, burada tarif edilen CAR, 4-1BB sinyalleme alanı içerir. CAR'ın sitoplazmik alanı, ilaveten CD3-zeta'nın sinyallama alanını içermesi için

tasarlanabilir. CAR'ın sitoplazmik alanı, CD3-zeta ve 4-1BB sinyalleme modülleri içerir. Bu doğrultuda, buluş CAR T hücreleri ve adoptif terapi için bunların kullanımlarını sağlar.

5 Burada tarif edildiği üzere, burada tarif edilen CAR T hücreleri, arzu edilen bir CAR, örneğin, anti-CD19, CD8 α menteşe ve transmembran alanı ve insan 4-1BB ve CD3-zeta sinyalleme alanları içeren bir CAR, içeren bir lentiviral vektörü hücrelerin içine uygulama ile üretilebilir. Buluşun CAR T hücreleri, sürdürülmüş tümör kontrolüne yol açabilen uzun-sürelili devamlılık ile sonuçlanarak *in vivo* çoğalabilir.

10

Kansere sahip olan veya kansere sahip olma riski altında olan bir hastanın lenfosit infüzyonu kullanılarak tedavisi için bir CAR eksprese eden genetik olarak modifiye edilmiş bir T hücrelerini uygulama da burada açıklanır. Tercihen, otolog lenfosit infüzyonu tedavide kullanılır. Otolog PBMC'ler, tedaviye ihtiyacı olan bir hastadan 15 toplanır ve T hücreleri burada tarif edilen ve teknikte bilinen yöntemler kullanılarak aktive edilir ve genişletilir ve akabinde hastaya geri infüze edilir.

CLL geliştirme riski altında olan bir hastanın tedavisi de burada açıklanır. Bir maligniteyi veya bir hastada kemoterapinin ve/veya immünoterapinin hastada anlamlı 20 immünosüpresyon ile sonuçlandığı, böylece, hastanın CLL geliştirme riskini arttırdığı, bir otoimmün hastalığı tedavi etmek de burada açıklanır.

Hem CD3-zeta hem de 4-1BB ko-stimülatör alan içeren bir antiCD19 CAR eksprese eden (aynı zamanda, CART19 T hücreleri olarak da ifade edilen) T hücreleri kullanılan 25 yöntemler de burada açıklanır. Burada tarif edildiği üzere CART19 T hücreleri, güçlü *in vivo* T hücresi genişlemesi geçirebilir ve kanda ve kemik iliğinde bir uzatılmış zaman süresi boyunca yüksek düzeylerde devam eden CD19-spesifik hafıza hücreleri oluşturabilir. Bazı durumlarda, bir hastaya infüze edilen CART19 T hücreleri, ilerlemiş kemoterapi-dirençli CLL'si olan hastalarda *in vivo* lösemi hücrelerini elimine edebilir.

30

Tanımlar

Aksi tanımlanmadıkça, burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimlerin, buluşun ilgili olan teknikte normal uzmanlığı olan biri tarafından yaygın bir şekilde anlaşılabilir ile aynı 35 anlama sahiptir. Burada tarif edilenlere benzer veya eş-değer herhangi bir yöntemin

veya malzemenin, mevcut buluşun test edilmesi için pratikte kullanılabilmesine rağmen, tercih edilen malzemeler ve yöntemler burada tarif edilir. Mevcut buluşu tarif etmede ve talep etmede, aşağıdaki terminoloji kullanılacaktır.

- 5 Burada kullanılan terminolojinin, yalnızca özel uygulamaları tarif etme amacı içindir ve sınırlayıcı olması amaçlanmaz.

"Bir" ve "biri" tanımlılıkları, tanımlılığın dilbilgisel objesinin birini veya birden fazlasını (*yani*, en az birini) ifade etmek için burada kullanılır. Örnek olarak, "bir eleman", bir eleman veya birden fazla eleman anlamına gelir.

Ölçülebilir bir değeri, örneğin, bir miktarı, geçici bir süresi ve benzerini, ifade ederken burada kullanıldığı şekliyle "yaklaşık" ile, belirtilen değerden $\pm\%20$ 'lik veya $\pm\%10$ 'luk, daha tercihen $\pm\%5$ 'lik, hatta daha tercihen $\pm\%1$ 'lik ve daha da tercihen $\pm\%0,1$ 'lik varyasyonları kapsamı, böylece varyasyonların açıklanan yöntemleri gerçekleştirmek için uygun olması, kastedilir

Burada kullanıldığı şekliyle, "aktivasyon", saptanabilir hücrel proliferasyon indüklemesi için yeterli bir şekilde stimüle edilmiş olan bir T hücrenin durumunu ifade eder. Aktivasyon ayrıca, indüklenmiş sitokin üretimi ve saptanabilir efektör fonksiyonlar ile de ilişkili olabilir. "aktive edilmiş T hücreleri" terimi, diğer şeyler arasında, hücre bölünmesi geçiren T hücrelerini ifade eder.

Burada kullanıldığı şekliyle, "antikor" terimi, bir antijeni spesifik olarak bağlayan bir immünoglobülin molekülünü ifade eder. Antikorlar, doğal kaynaklardan veya rekombinant kaynaklarda türetilen aynın immünoglobülinler olabilir veya aynen immünoglobülinlerin immüno-reaktif kısımları olabilir. Antikorlar tipik olarak, immünoglobülin molekülünün tetramerleridir. Mevcut buluştaki antikorlar, örneğin, poliklonal antikorları, monoklonal antikorları, Fv, Fab ve F(ab)₂ aynı zamanda tek zincirli antikorları ve beşerleştirilmiş antikorları içeren çeşitli formlarda var olabilir (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

"Antikor fragmanı" terimi, bir aynen antikorun bir kısmını ifade eder ve bir aynen antikorun antijenik belirleme değişken bölgelerini ifade eder. Antikor fragmanlarının örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, Fab, Fab', F(ab')₂ ve Fv fragmanlarını, lineer antikorları, scFv antikorlarını ve antikor fragmanlarından oluşturulmuş multi-spesifik antikorları içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle, bir "antikor ağır zinciri", tüm antikor moleküllerinin bunların doğal oluşumlu konformasyonlarında bulunan polipeptit zincirlerinin iki tipinden daha büyük olanını ifade eder.

Burada kullanıldığı şekliyle, bir "antikor hafif zinciri", tüm antikor moleküllerinin bunların doğal oluşumlu konformasyonlarında bulunan polipeptit zincirlerinin iki tipinden daha küçük olanını ifade eder, κ ve λ hafif zincirleri, iki majör antikor hafif zincir izotipini ifade eder.

Burada kullanıldığı şekliyle, "sentetik antikor" terimi ile, rekombinant DNA teknolojisi kullanılan üretilen bir antikor, örneğin, mesela burada tarif edildiği üzere bir bakteriyofaj tarafından eksprese edilen bir antikor, kastedilir. Terim ayrıca, antikoru şifreleyen ve bir antikor proteinini eksprese eden, bir DNA molekülünün veya antikoru belirten bir amino asit dizisinin sentezi ile üretilmiş olan bir antikor anlamına geldiği şekilde de yorumlanmalıdır, burada DNA veya amino asit dizisi, mevcut olan ve teknikte iyi bilinen sentetik DNA veya amino asit dizisi teknolojisi kullanılarak elde edilmiştir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "antijen" veya "Ag" terimi, bir immün yanıtı provoke eden bir molekül olarak tanımlanır. Bu immün yanıt, antikor üretimini veya spesifik immünolojik olarak-kompetan hücrelerin aktivasyonunu veya her ikisini içerebilir. Uzmanlığı olan kişi, neredeyse tüm proteinleri veya peptitleri içeren, herhangi bir makro-molekül bir antijen görevi görebilir. Dahası, antijenler, rekombinant veya genomik DNA'dan türetilir. Uzmanlığı olan bir kişi, bir immün yanıt meydana getiren bir proteini şifreleyen bir nükleotid dizisi veya bir parsiyel nükleotid dizisi içeren, bundan dolayı bu terim olarak bir "antijen" şifreleyen, herhangi bir DNA'nın kullanıldığını anlayacaktır. Dahası, teknikte uzmanlığı olan bir kişi, bir antijenin yalnızca bir genin bir tam-boy nükleotid dizisinden şifrelenmesi gerekmediğini anlayacaktır. Mevcut buluşun, bununla sınırlı kalmamak kaydıyla, birden fazla genin parsiyel nükleotid dizilerinin kullanılmasını içerdiği ve bu nükleotid dizilerinin arzu edilen immün yanıtı meydana

getirmek için çeşitli kombinasyonlarda düzenlendiği kolaylıkla görülecektir. Dahası, uzmanlığı olan bir kişi, bir antijenin, hiç de bir "gen" tarafından şifrenmesi gerekmediğini anlayacaktır. Bir antijenin üretilebileceği, sentezlenebileceğini veya bir biyolojik örnekten türetilebileceği kolaylıkla görülecektir. Bu tarz bir biyolojik örnek, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bir doku örneğini, bir tümör örneğini, bir hücreyi veya bir biyolojik akışkanı, içerebilir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "anti-tümör etki" terimi, tümör hacminde bir düşüş, tümör hücrelerinin sayısında bir düşüş, metastazların sayısında bir düşüş, beklenen yaşam süresinde bir artış veya kanserli rahatsızlık ile ilişkili çeşitli fizyolojik semptomların sağlatılması ile açığa çıkarılabilen bir biyolojik etkiyi ifade eder. Bir "anti-tümör etki" ayrıca, buluşun peptitlerinin, polinükleotidlerinin, hücrelerinin ve antikorlarının birinci yerde tümörün meydana gelinin önlenmesindeki yetisi ile de açığa çıkarılabilir.

Mevcut buluşa uygun olarak, "oto-antijen" terimi, immün sistem tarafından yanlılıkla yabancı olarak tanınan herhangi bir kendi-antijeni anlamına gelir. Oto-antijenler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, hücresel proteinleri, fosfoproteinleri, hücresel yüzey proteinlerini, hücresel lipitleri, nükleik asitleri, hücre yüzeyi reseptörlerini içeren glikoproteinleri, içerir.

20

Burada kullanıldığı şekliyle, "otoimmün hastalık" terimi, bir otoimmün yanıtta kaynaklanan bir bozukluk olarak tanımlanır. Bir otoimmün hastalık, bir kendi-antijenine uygun olmayan ve aşırı bir yanıtın sonucudur. Otoimmün hastalıkların örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, diğerleri arasında, Addison hastalığını, alopesi areatayı, ankilozan spondiliti, otoimmün hepatiti, otoimmün parotiti, Crohn hastalığını, diyabeti (Tip I), distrofik epidermoliz büllözu, epididimiti, glomerülonefriti, Grave hastalığını, Guillain-Barr sendromunu, Hashimoto hastalığını, hemolitik anemiyi, sistemik lupus eritematözünü, multipl sklerozu, miyastenia gravis, pemfigus vulgarisi, psöriyazisi, romatizmal ateşi, romatoid artrit, sarkoidozu, sklerodermayı, Sjogren sendromunu, spondiloartropatileri, tiroiditi, vaskülit, vitiligoyu, miksödemi, pernisiyöz anemiyi, ülseratif koliti, içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "otolog" teriminin, bunun daha sonra bireye geri uygulandığı aynı bireyden türetilen herhangi bir malzemeyi ifade etmesi kastedilir.

35

"Allojeneik", aynı türün farklı bir hayvanından türetilen bir grefti ifade eder.

"Ksenojeneik", farklı bir türün bir hayvanından türetilen bir grefti ifade eder.

5 Burada kullanıldığı şekliyle, "kanser" terimi, aberan hücrelerin çabuk ve kontrolsüz büyümesi ile karakterize edilen bir hastalık olarak tanımlanır. Kanser hücreleri, lokal olarak veya kan dolaşımı ve lenfatik sistem ile vücudun diğer kısımlarına yayılabilir. Çeşitli kanserlerin örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, meme kanserini, prostat kanserini, ovaryan kanseri, servikal kanseri, cilt kanserini, pankreatik kanseri, 10 kolorektal kanseri, renal kanseri, karaciğer kanserini, beyin kanserini, lenfomayı, lösemiye, akciğer kanserini ve benzerlerini içerir.

Burada kullanılan terim olarak "ko-stimülatör ligand", bir T hücresi üzerindeki bir soydaş ko-stimülatör molekülü spesifik olarak bağlayan, böylece, örneğin, bir TCR/CD3 15 kompleksinin peptit ile yüklenmiş bir MHC molekülü ile bağlanması ile sağlanan primer sinyale ek olarak, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, proliferasyonu, aktivasyonu, farklılaşmayı ve benzerlerini içeren bir T hücresi yanıtına aracılık eden bir sinyal sağlayan, bir antijen sunan hücre (örn., bir aAPC, dentritik hücre, B hücresi ve benzerleri) üzerindeki bir molekülü içerir. Bir ko-stimülatör ligand, bunlarla sınırlı 20 kalmamak kaydıyla, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BB, OX40L, indüklenebilir ko-stimülatör ligandı (ICOS-L), interselüler adhezyon molekülünü (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, lenfotoksin beta reseptörünü, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, Toll ligandı reseptörünü bağlayan bir agonisti veya antikorunu ve B7-H3 ile spesifik olarak bağlayan bir ligandı içerebilir. Bir ko- 25 stimülatör ligand ayrıca, *inter alia*, bir T hücresi üzerinde bulunan bir ko-stimülatör molekül ile spesifik olarak bağlayan bir antikorunu, örneğin, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, lenfosit fonksiyonu- ilişkili antijen-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 ve CD83 ile spesifik olarak bağlayan bir ligandı, da kapsar.

30

Bir "ko-stimülatör molekül", bir ko-stimülatör ligand ile spesifik olarak bağlayan, böylece T hücresi ile bir ko-stimülatör yanıtına, örneğin, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, proliferasyona, aracılık eden, bir T hücresi üzerindeki soydaş bağlama partnerini ifade eder. Ko-stimülatör moleküller, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bir MHC sınıf I 35 molekülünü, BTLA ve bir Toll ligand reseptörünü, içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle, bir "ko-stimülatör sinyal", bir primer sinyal ile kombinasyonun, örneğin, TCR/CD3 ligasyonunun, T hücresi proliferasyonuna ve/veya anahtar moleküllerin yukarı yönde regülasyonunu veya aşağı yönde regülasyonuna yol açan bir sinyali ifade eder.

5

Bir "hastalık", bir hayvanın bir sağlık durumudur, burada hayvan homeostazı idame ettiremez ve burada hastalık sağaltılmadığında, hayvanın sağlığı kötüleşmeye devam eder. Aksine, bir hayvanda bir "bozukluk", hayvanın homeostazı idame ettirebildiği ancak hayvanın sağlık durumunun bunun bozukluk yokluğunda olacağına kıyasla daha az iyi olduğu bir sağlık durumudur. Tedavi edilmeden bırakıldığında, bir bozukluğun hayvanın sağlık durumunda ilave bir düşüşe neden olması gerekmez.

10

Burada kullanıldığı şekliyle, bir "etkili miktar", bir terapötik veya profilaktik yarar sağlayan bir miktar anlamına gelir.

15

"Şifreleyen", tanımlanmış bir nükleotid dizisine (yani, rRNA, tRNA ve mRNA) veya tanımlanmış bir amino asit dizisine ve bunlardan kaynaklanan biyolojik özelliklere sahip olan biyolojik proseslerde diğer polimerin ve makro-moleküllerin sentezi için şablonlar görevi gören, bir polinükleotid, örneğin, bir gen, bir cDNA veya bir mRNA, içindeki spesifik nükleotid dizilerinin kalıtsal özelliğini ifade eder. Böylelikle, bir gen, bu gene karşılık gelen mRNA'nın transkripsiyonu ve translasyonu bir hücre veya bir başka biyolojik sistem içinde protein ürettiğinde, bir proteini şifreler. Hem nükleotid dizisi mRNA dizisine özdeş olan ve genel olarak dizisi listelerinde sağlanan kodlayan sarmal hem de bir genin veya cDNA'nın transkripsiyonu için şablon olarak kullanılan kodlamayan sarmal, bu genin veya cDNA'nın proteinini veya başka ürününü şifrelediği şekilde ifade edilebilir.

20

25

Burada kullanıldığı şekliyle, "endojen" terimi, bir organizmadan, hücreden, dokudan veya sistemden elde edilen veya bunların içinde üretilen herhangi bir maddeyi ifade eder.

30

Burada kullanıldığı şekliyle, "ekzojen" terimi, bir organizmadan, hücreden, dokudan veya sistemden uygulanan veya bunların dışında üretilen herhangi bir maddeyi ifade eder.

35

Burada kullanıldığı şekliyle, "ekspresyon" terimi, bunun promotörü ile yön verilen bir özel nükleotid dizisinin transkripsiyonu ve/veya translasyonu olarak tanımlanır.

"Ekspresyon vektörü", eksprese edilecek olan bir nükleotid dizisine operatif olarak bağlı olan ekspresyon kontrol dizilerini içeren bir rekombinant polinükleotid içeren bir vektörü ifade eder. Bir ekspresyon vektörü ekspresyon için yeterli cis-etki eden elemanlar içerir; ekspresyon için diğer elemanlar, konak hücre tarafından veya bir *in vitro* ekspresyon sistemi içinde sağlanabilir. Ekspresyon vektörleri, teknikte bilinenlerin tümünü, örneğin, rekombinant polinükleotidi bünyesinde barındıran kozmidleri, plazmitleri (örn., çıplak veya lipozomlar içine dâhil edilmiş) ve virüsleri (örn., lentivirüsleri, retrovirüsleri, adenovirüsleri ve adeno-ilişkili virüsleri) içerir.

"Homolog", iki polipeptit arasındaki veya iki nükleik asit molekülü arasındaki dizi benzerliğini veya diziş özdeşliğini ifade eder. Dizilere kıyasla her ikisindeki bir pozisyon aynı baz veya amino asit monomer alt-birimi tarafından meşgul edildiğinde, örn., iki DNA molekülünün her birindeki bir pozisyon adenin tarafından meşgul edildiğinde, moleküller bu pozisyonda homologdur. İki dizi arasındaki homoloji yüzdesi, bir karşılaştırılan pozisyonların sayısı ile bölünmüş iki dizi tarafından paylaşılan eşleşen veya homolog pozisyonların sayısı x 100 fonksiyonudur. Örneğin, iki dizisi içindeki pozisyonların 10'unun 6'sı eşleştiğinde veya homolog olduğunda, iki dizisi %60 homologdur. Örnek olarak, DNA dizileri ATTGCC ve TATGGC %50 homoloji paylaşır. Genel olarak, iki dizi maksimum homoloji vermesi için hizalandığında, bir karşılaştırma yapılır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "immünoglobülin" veya "Ig" terimi, antikolar olarak işlev gösteren bir protein sınıfı olarak tanımlanır. B hücreleri tarafından eksprese edilen antikolar bazen, BCR (B hücresi reseptörü) veya antijen reseptörü olarak ifade edilir. Bu protein sınıfına dâhil edilen beş üye, IgA, IgG, IgM, IgD ve IgE'dir. IgA, vücut salgılarında, örneğin, tükürükte, gözyaşlarında, anne sütünde, gastrointestinal salgılarda ve respiratuvar ve genitoüriner yolların mukus salgılarında, bulunan primer antikordur. IgG, dolaşımdaki en yaygın antikordur. IgM, çoğu süjude primer immün yanıtta üretilen ana immünoglobülinidir. Bu, aglütinasyondaki, kompleman fiksasyonundaki ve diğer antikor yanıtlarındaki en etkili immünoglobülinidir ve bakterilere ve virüslere karşı savunmada önemlidir. IgD, bilinen antikor fonksiyonu olmayan, ancak bir antijen reseptörü görevi görebilen immünoglobülinidir. IgE, alerjene

maruziyet üzerine mast hücrelerin ve bazofillerden mediyatörlerin salımına neden olma ile hemen hipersensitiviteye aracılık eden immünoglobülinidir.

Burada kullanıldığı şekliyle, bir "eğitici materyal", buluşun bileşimlerinin ve yöntemlerinin yararlılığını iletmek için kullanılabilen bir yayını, bir kaydı, bir diyagramı veya herhangi bir başka ifade ortamını içerir. Buluşun kitinin eğitici materyal, örneğin, buluşun nükleik asidini, peptidini ve/veya bileşimini içeren bir kaba iliştilerilebilir veya buluşun nükleik asidini, peptidini ve/veya bileşimini içeren bir kap ile birlikte nakledilebilir. Alternatif olarak, eğitici materyal eğitici materyalin ve bileşiğın alıcı ile iş birliğı yapılarak kullanılası niyeti ile kaptan ayrı bir şekilde nakledilebilir.

"İzole edilmiş (izole)", doğal durumundan değiştirilmiş veya uzaklaştırılmış anlamına gelir. Örneğin, bir canlı hayvanda doğal olarak bulunan bir nükleik asit veya bir peptit "izole değildir", ancak bunun doğal durumunda birlikte-bulunduğı maddelerden kısmen veya tamamen ayrılmış aynı nükleik asit veya peptit, "izoledir". Bir izole edilmiş nükleik asit veya protein, büyük ölçüde saflaştırılmış formda bulunabilir veya bir natif-olmayan çevrede, örneğin, mesela, bir konak hücre içinde, bulunabilir.

Mevcut buluşun bağlamında, yaygın olarak bulunan nükleik asit bazları için aşağıdaki kısaltmalar kullanılır. "A" adenozini ifade eder, "C" sitozini ifade eder, "G" guanozini ifade eder, "T" timidini ifade eder ve "U" üridini ifade eder.

Aksi belirtilmedikçe, "bir amino asit dizisi şifreleyen bir nükleotid dizisi", bir diğlerinin dejenerat versiyonları olan ve aynı amino asit dizisini şifreleyen tüm nükleotid dizilerini içerir. Bir protein veya bir RNA şifreleyen nükleotid dizisi ifadesi ayrıca, proteini şifreleyen nükleotid dizisinin, bazı versiyonlarda, bir intron (intronlar) içerebileceğı kadarıyla intronlar da içerebilir.

Burada kullanıldığı şekliyle, bir "lentivirüs", Retroviridae familyasının bir cinsini ifade eder. Lentivirüsler, bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmede retrovirüsler arasında eşsizdir; bunlar anlamlı bir miktardaki genetik bilgiyi konak hücrenin DNA'sı içine aktarabilir, böylece bunlar bir gen aktarım vektörünün en etkili yöntemlerinden biridir. HIV, SIV ve FIV, tümü lentivirüslerin örnekleridir. Lentivirüslerden türetilen vektörler, *in vivo* gen transferinin anlamlı düzeylerini başarmak için araçlar sunar.

Burada kullanıldığı şekliyle, "modüle etme" terimi ile, bir tedavinin veya bileşiğin yokluğunda süjedeki bir yanıtın düzeyi ile karşılaştırıldığında ve/veya bunun dışında özdeş ancak tedavi edilmemiş bir süjede bir yanıtın düzeyi ile karşılaştırıldığında bir süjede bir yanıtın düzeyinde saptanabilir bir artışa veya düşüşe aracılık etme kastedilir.

5 Terim, bir natif sinyali veya yanıtı bozmayı ve/veya etkilemeyi, böylece bir süjede, tercihen, bir insanda, bir yararlı terapötik yanıtı aracılık etmeyi, kapsar.

Aksi belirtilmedikçe, "bir amino asit dizisini şifreleyen bir nükleotid dizisi", bir diğerinin dejenerat versiyonları olan ve aynı amino asit dizisini şifreleyen tüm nükleotid dizilerini
10 içerir. Proteinleri ve RNA'yı şifreleyen nükleotid dizileri intronları içerir.

"Operatif olarak bağlı" terimi, bir regülatör dizi ve bir heterolog nükleik asit dizisi arasında heterolog nükleik asit dizisinin ekspresyonuna neden olan fonksiyonel bağlantıyı ifade eder. Örneğin, bir birinci nükleik asit dizisi ikinci nükleik asit dizisi ile bir
15 fonksiyonel ilişki içinde yer aldığı anda, bir birinci nükleik asit dizisi bir ikinci nükleik asit dizisi ile operatif olarak bağlıdır. Örneğin, promotör kodlayan dizisinin transkripsiyonunu veya ekspresyonunu etkilediğinde, bir promotör bir kodlayan diziye operatif olarak bağlıdır. Genel olarak, operatif olarak bağlı DNA dizileri bitişiktir ve iki protein kodlayan bölgenin birleşmesi gerektiğinde, aynı okuma çerçevesi içindedir.

20

"Aşırı-eksprese edilmiş" tümör antijeni veya tümör antijeninin "aşırı-ekspresyonu" teriminin, bu dokudan veya organdan bir normal hücre içindeki ekspresyon düzeyine kıyasla hastaların spesifik bir dokusu veya organı içinde bir solid tümör gibi bir hastalık alanından bir hücredeki tümör antijeninin ekspresyonunun anormal bir düzeyini
25 göstermesi amaçlanır. Tümör antijeninin aşırı-ekspresyonu ile karakterize edilen solid tümörlere veya bir hematolojik maligniteye sahip olan hastalar, teknikte bilinen standart analizler ile belirlenebilir.

Bir immünojenik bileşimin "parenteral" uygulaması, örn., subkütan (s.c.), intravenöz
30 (i.v.), intramüsküler (i.m.) veya intrasternal enjeksiyonu veya infüzyon tekniklerini, içerir.

"Hasta", "süje", "birey" ve benzeri terimler burada birbiri yerine kullanılır ve burada tarif edilen, *in vitro* veya *in situ*, yöntemler için uygun olan herhangi bir hayvanı veya bunun hücrelerini ifade eder. Belirli sınırlayıcı olmayan uygulamalarda, hasta, süje veya birey
35 bir insandır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "polinükleotid" terimi, bir nükleotid zinciri olarak tanımlanır. Dahası, nükleik asitler nükleotid polimerleridir. Böylelikle, burada kullanıldığı şekliyle nükleik asitler veya polinükleotidler birbiri ile değiştirilebilir. Teknikte uzmanlığı olan bir kişi, nükleik asitlerin, monomerik "nükleotidlere" hidrolize edilebilen, polinükleotidler
 5 olduğu genel bilgisine sahip olacaktır. Monomerik nükleotidler, nükleosidlere hidrolize edilebilir. Burada kullanıldığı şekliyle, polinükleotidler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, sınırlandırma olmaksızın, rekombinant yolları, yani, bir rekombinant kütüphaneden veya bir hücre genomundan nükleik asit dizilerinin, olağan klonlama teknolojileri veya PCR™ kullanılarak klonlanmasını, ve benzerlerini içeren teknikte
 10 mevcut olan herhangi bir araç ile veya sentetik araçlar ile elde edilen tüm nükleik asit dizilerini içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "peptit", "polipeptit" ve "protein" terimleri, birbiri yerine kullanılır ve peptit bağları ile kovalent olarak bağlı olan amino asit rezidülerinden oluşan
 15 bir bileşiği ifade eder. Bir protein veya peptit, en az iki amino asit içermelidir ve bir protein veya peptit dizisinin içerebileceği amino asitlerin maksimum sayısı konusunda bir sınırlandırma yoktur. Polipeptitler, bir diğerine peptit bağları ile bağlı olan iki veya daha fazla amino asit içeren herhangi bir peptidi veya proteini içerir. Burada kullanıldığı şekliyle, terim hem aynı zamanda teknikte yaygın bir şekilde, örneğin, peptitler,
 20 oligopeptitler ve oligomerler olarak ifade edilen kısa zincirleri, hem de çok fazla tipi olan, genel olarak teknikte proteinler olarak ifade edilen, uzun zincirleri ifade eder. "Polipeptitler", diğerleri arasında, örneğin, biyolojik olarak aktif fragmanları, büyük ölçüde homolog polipeptitleri, oligopeptitleri, homodimerleri, heterodimerleri, polipeptitlerin varyantlarını, modifiye edilmiş polipeptitleri, türevleri, analogları, füzyon
 25 proteinlerini, içerir. Polipeptitler, doğal peptitleri, rekombinant peptitleri, sentetik peptitleri veya bunların bir kombinasyonunu içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "promotör" terimi, hücrenin sentetik mekanizması tarafından tanınan veya sentetik mekanizmaya uygulanan, bir polinükleotid dizisinin
 30 spesifik transkripsiyonunu başlatmak için gerekli olan, bir DNA dizisi olarak tanımlanır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "promotör/regülatör dizi" terimi, promotör/regülatör dizisine operatif olarak bağlı olan bir gen ürününün ekspresyonu için gerekli olan bir nükleik asit dizisi anlamına gelir. Bazı durumlarda, bu dizi, çekirdek promotör dizisi olabilir ve diğer
 35 durumlarda, bu dizi ayrıca, bir hızlandırıcı dizisi veya gen ürününün ekspresyonu için

gerekli olan başka regülatör elemanları da içerebilir. Promotör/regülatör dizi, örneğin, gen ürününü bir doku spesifik şekilde eksprese eden bir dizi olabilir.

5 Bir "konstitütif" promotör, bir gen ürününü şifreleyen veya belirten bir polinükleotid ile operatif olarak bağlı olduğunda gen ürününün hücrenin çoğu veya tüm fizyolojik koşulları altında bir hücre içinde üretilmesine neden olan, bir nükleotid dizisidir.

10 Bir "indüklenebilir" promotör, bir gen ürününü şifreleyen veya belirten bir polinükleotid ile operatif olarak bağlı olduğunda gen ürününün bir hücrede büyük ölçüde yalnızca promotöre karşılık gelen bir indükleyici hücre içinde bulunduğu üretilmesine neden olan, bir nükleotid dizisidir.

15 Bir "soku-spesifik" promotör, bir geni şifreleyen veya bir gen tarafından belirten bir polinükleotid ile operatif olarak bağlı olduğunda gen ürününün bir hücrede büyük ölçüde yalnızca hücre promotöre karşılık gelen doku tipinin bir hücresi olduğunda üretilmesine neden olan, bir nükleotid dizisidir.

20 Bir antikora ilişkin burada kullanıldığı şekliyle "spesifik olarak bağlar" terimi ile, bir spesifik antijeni tanıyan, ancak bir örnek içinden diğer molekülleri büyük ölçüde tanımayan veya bağlamayan bir antikor kastedilir. Örneğin, bir başka türden bir antijeni spesifik olarak bağlayan bir antikor ayrıca, bir veya birden fazla türden bu antijeni de bağlayabilir. Buna rağmen, bu tarz çapraz-tür reaktivitesi kendi başına, bir antikorun spesifik olarak sınıflandırılmasını değiştirmez. Bir başka örnekte, bir antijeni spesifik olarak bağlayan bir antikor ayrıca, antijenin farklı allelik formlarını da bağlayabilir. Buna

25 rağmen, bu tarz çapraz reaktivite kendi başına, bir antikorun spesifik olarak sınıflandırılmasını değiştirmez. Bazı durumlarda, "spesifik bağlama" veya "spesifik olarak bağlama" terimleri, bir antikorun, bir proteinin veya bir peptidin bir ikinci kimyasal tür ile etkileşime atfen, etkileşimin kimyasal tür üzerinde özel bir yapının (örn., bir antijenik belirleyicinin veya epitopun) varlığına bağlı olduğunu kastetmek için

30 kullanılabilir; örneğin, bir antikor genel olarak proteinlerden ziyade spesifik bir protein yapısını tanıyabilir ve bağlar. Bir antikor epitop "A"ya spesifik olduğunda, etiketlenmiş "A" ve antikor içeren bir reaksiyonda, epitop A içeren bir molekülün (veya serbest, etiketlenmemiş A'nın) varlığı, antikora bağlı etiketlenmiş A'nın miktarını düşürecektir.

"Stimülasyon" terimi ile, bir stimülatör molekülün (örn., bir TCR/CD3 kompleksinin) bunun soydaş ligandı ile bağlama ile indüklenmiş, böylece bir sinyal iletim yoluna, örneğin, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, TCR/CD3 kompleksi yoluyla sinyal iletimine, aracılık eden, bir primer yanıt kastedilir. Stimülasyon, belirli moleküllerin

5 değiştirilmiş ekspresyonuna, örneğin, TGF- β 'nin aşağı yönde regülasyonuna ve/veya sitoskeletal yapıların yeniden-organizasyonuna ve benzerlerine aracılık edebilir.

Burada kullanılan terim olarak bir "stimülatör molekülü" bir antijen sunan hücre üzerinde bulunan bir soydaş stimülatör ligandı ile spesifik olarak bağlayan bir T hücresi

10 üzerinde bulunan bir molekül anlamına gelir.

Burada kullanıldığı şekliyle, bir "stimülatör ligandı", bir antijen sunan hücre (örn., bir aAPC, bir dentritik hücre, bir B-hücresi ve benzerleri) üzerinde bulunduğu, bir T hücresi üzerinde (burada bir "stimülatör molekül" olarak ifade edilen) bir soydaş

15 bağlama partneri ile spesifik olarak bağlayabilen, böylece bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, aktivasyonu, bir immün yanıtın başlatılmasını, proliferasyonu ve benzerlerini içeren, T hücresi tarafından bir primer yanıtta aracılık eden, bir ligand anlamına gelir. Stimülatör ligandlar teknikte iyi-bilinir ve, *inter alia*, bir peptit ile yüklü olan bir MHC Sınıf I molekülünü, bir anti-CD3 antikorunu, bir süper-agonist anti-CD28 antikorunu ve bir

20 süper-agonist anti-CD2 antikorunu kapsar.

"Süje" teriminin, bir immün yanıtın meydana getirilebildiği canlı organizmaları (örn., memelileri) içermesi amaçlanır. Süjelerin örnekleri, insanları, köpekleri, kedileri, fareleri, sıçanları ve bunların transgenik türlerini içerir.

25

Burada kullanıldığı şekliyle, bir "büyük ölçüde saflaştırılmış" hücre, esas olarak diğer hücre tiplerinden yoksun olan bir hücredir. Bir büyük ölçüde saflaştırılmış hücre ayrıca, bunun normalde bunun doğal oluşumlu hâlinde bunlarla ilişkili olduğu diğer hücre tiplerinden ayrılmış olan bir hücreyi de ifade eder. Bazı durumlarda, büyük ölçüde

30 saflaştırılmış hücrelerin bir popülasyonu, hücrelerin bir homojen popülasyonunu ifade eder. Diğer durumlarda, bu terim basit bir şekilde, bunların doğal hâllerinde bunlarla ilişkili olan hücrelerden ayrılmış olan hücreyi ifade eder. Bazı uygulamalarda, hücreler *in vitro* kültürlenir. Diğer uygulamalarda, hücreler *in vitro* kültürlenmez.

Burada kullanıldığı şekliyle, "terapötik" terimi, bir tedavi ve/veya profilaksi anlamına gelir. Bir terapötik etki, bir hastalık hâliinden süpresyon, remisyon veya eradikasyon ile elde edilir.

- 5 "Terapötik olarak etkili miktar" terimi, söz konusu bileşiğin araştırmacı, veteriner, tıbbi doktor veya başka klinisyen tarafından araştırılmakta olan bir dokunun, sistemin veya süjenin biyolojik veya tıbbi yanıtını meydana getirecek olan miktarını ifade eder. "Terapötik olarak etkili miktar" terimi, bir bileşiğin, uygulandığında, tedavi edilmekte olan bozukluğun veya hastalığın bulgularının veya semptomlarının birinin veya birden
- 10 fazlasının gelişmesini önlemek veya bunları bir dereceye kadar hafifletmek için etkili olan miktarını içerir. Terapötik olarak etkili miktar, bileşiğe, hastalığa ve bunun şiddetine tedavi edilecek olan süjenin yaşına, kilosuna, vb. bağlı olarak çeşitlilik gösterecektir.
- 15 Burada kullanılan terim olarak bir hastalığı "tedavi etmek", bir süjenin sahip olduğu bir hastalığın veya bozukluğun en az bir bulgusunun veya semptomunun sıklığını ve şiddetini azaltma anlamına gelir.

- Burada kullanıldığı şekliyle, "transfekte edilmiş" veya "transforme edilmiş" veya
- 20 "aktarılmış" terimi, bununla ekzojen nükleik asidin konak hücreye transfer edildiği veya uygulandığı bir prosesi ifade eder. Bir "transfekte edilmiş" veya "transforme edilmiş" veya "aktarılmış" hücre, ekzojen nükleik asit ile transfekte edilmiş, transforme edilmiş veya aktarılmış hücredir. Hücre, primer süje hücrelerini veya bunun projenisini içerir.

- 25 Burada kullanıldığı şekliyle, "transkripsiyonel kontrol altında" veya "operatif olarak bağlı" ifadesi, promotörün RNA polimeraz ile transkripsiyonun başlatılmasını ve polinükleotidin ekspresyonunu kontrol etmek için bir polinükleotide istinaden doğru lokasyonda ve oryantasyonda olduğu anlamına gelir.

- 30 Bir "vektör", bir izole edilmiş nükleik asit içeren ve izole edilmiş nükleik asidi bir hücrenin içine aktarmak için kullanılabilen bir madde bileşimidir. Bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, lineer polinükleotidleri, iyonik veya amfilik bileşikler ile ilgili olan polinükleotidleri, plazmitleri ve virüsleri içeren çok sayıda vektör teknikte bilinir. Böylelikle, "vektör" terimi, bir otonomik olarak kopyalayan plazmidi veya bir virüsü
- 35 içerir. Terimin ayrıca, nükleik asidin hücrelere transferini kolaylaştıran plazmit-olmayan

ve viral-olmayan bileşikleri, örneğin, mesela, polilizin bileşiklerini, lipozomları ve benzerlerini, içerdiği şekilde de yorumlanmalıdır. Viral vektörlerin örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, adenoviral vektörleri, adeno-ilişkili virüs vektörlerini, retroviral vektörleri ve benzerlerini içerir.

5

Aralıklar: bu açıklama boyunca, buluşun çeşitli yönleri bir aralık formatında sunulabilir. Aralık formatındaki açıklamanın yalnızca kolaylık ve özlülük için olduğu anlaşılmalıdır ve buluşun kapsamı konusunda esnetilemeyen bir sınırlandırma şeklinde anlam çıkarılmamalıdır. Bu doğrultuda, bir aralığın açıklamasının, spesifik olarak açıklanan tüm olası alt-aralıklara aynı zamanda bu aralık içindeki münferit sayısal değerlere sahip olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, bir aralığın, örneğin, 1 ila 6 aralığının, açıklamasının spesifik olarak açıklanan alt-aralıklara, örneğin, 1 ila 3, 1 ila 4, 1 ila 5, 2 ila 4, 2 ila 6, 3 ila 6, vb. aralıklara aynı zamanda bu aralık içindeki münferit sayılara, örneğin, 1, 2, 3,7, 3, 4, 5, 5,3 ve 6'ya, sahip olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu aralığın genişliğine bakılmaksızın geçerlidir.

15

Açıklama

Açıklama

20

Mevcut buluş kanseri tedavi etmek için bileşimler sağlar. Kanser, bir hematolojik malignite, bir solid tümör, bir primer veya bir metastaz yapan tümör olabilir. Tercihen, kanser, bir hematolojik malignitedir ve daha tercihen, kanser Kronik Lenfositik Lösemidir (CLL).

25

Bir uygulamada, buluş bir CAR eksprese etmesi için mühendislik uygulanmış bir T hücresi sağlar, burada CAR T hücresi, burada tanımlandığı üzere bir anti-tümör özellik gösterir. CAR'a, T hücresi antijen reseptörü kompleksi zeta zincirinin CD3 zeta intraselüler sinyalleme alanına kaynaştırılmış bir CD 19 antijen bağlama alanına sahip olan bir ekstraselüler alan içermesi için mühendislik uygulanabilir. Bir T hücresi içinde eksprese edildiğinde CAR, antijen bağlama özgüllüğüne dayanarak antijen tanımayı yeniden-yönlendirebilir. CD19, maligne B hücreleri üzerinde eksprese edilir. Antijen bağlama kısmı, bir ko-stimülatör molekülden bir intraselüler alan ve bir CD137 (4-1BB) sinyalleme alanı ve bir CD3-zeta sinyal alanı olan bir zeta zinciri ile kaynaştırılır.

35

Burada tarif edildiği üzere, CAR, bir CD137 (4-1BB) sinyalleme alanı içerir. Bunun nedeni, mevcut buluşun kısmen, CAR-aracılı T-hücreleri yanıtlarının ko-stimülatör alanların eklenmesi ile ilaveten hızlandırılabilceği keşfine dayanmasıdır. Örneğin, CD137 (4-1BB) sinyalleme alanının dâhil edilmesi, anti-tümör aktivitesini ve CAR T hücrelerinin *in vivo* devamlılığını CD137 (4-1BB) eksprese etmesi için mühendislik uygulanmamış bunun dışında özdeş olan CAR T hücrelerine kıyasla anlamlı bir şekilde arttırmıştır.

Bileşim

10

Mevcut buluş, burada tanımlandığı üzere bir ekstraselüler ve intraselüler alan içere bir kimerik antijen reseptörü (CAR) eksprese etmesi için genetik olarak modifiye edilmiş t hücrelerinin kullanılmasını sağlar. Ekstraselüler alan, aksi durumda bir antijen bağlama kısmı olarak ifade edilen bir hedef-spesifik bağlama elemanı içerir. İntraselüler alan veya aksi durumda sitoplazmik alan, bir ko-stimülatör sinyalleme bölgesi ve bir zeta zincir kısmı içerir. Ko-stimülatör sinyalleme bölgesi, bir ko-stimülatör molekülün intraselüler alanını içeren bir CAR kısmını ifade eder. Ko-stimülatör moleküller, antijen reseptörleri veya bunların lenfositlerin antijene etkili bir yanıtı için gerekli olan ligandları dışındaki hücre yüzeyi molekülleridir.

20

CAR'ın ekstraselüler alanı ve transmembran alanı arasına veya CAR'ın sitoplazmik alanı ve transmembran alanı arasına, bir aralayıcı alan katılabilir. Burada kullanıldığı şekliyle, "aralayıcı alan" terimi genel olarak, polipeptit zinciri içinde transmembran alanı ya ekstraselüler alana veya sitoplazmik alana bağlama görevi gören herhangi bir oligo- veya polipeptit anlamına gelir. Bir aralayıcı alanı, en fazla 300 amino asit, tercihen 10 ila 100 amino asit ve en tercihen 25 ila 50 amino asit içerebilir.

25

Antijen bağlama kısmı

Burada tarif edilen CAR, aksi durumda bir antijen bağlama kısmı olarak ifade edilen bir hedef-spesifik bağlama elemanı içerir.

30

Mevcut açıklamanın bağlamında, "tümör antijeni" veya "hiperproliferatif bozukluk antijen" veya "bir hiperproliferatif bozukluk ile ilişkili antijen", spesifik hiperproliferatif bozukluklar, örneğin, kanser, için ortak olan antijenleri ifade eder. Burada tartışılan

35

antijenler yalnızca örnek olarak dâhil edilir. Listenin dışlayan olması amaçlanmaz ve ilave örnekler teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından kolaylıkla görülecektir.

Tümör antijenleri, bir immün yanıt, özellikle T-hücresi aracılı immün yanıtlar, meydana getiren tümör hücreleri tarafından üretilen proteinlerdir. Tümör antijenleri teknikte iyi bilinir ve örneğin, bir gliyom-ilişkili antijeni, karsinoembriyonik antijeni (CEA), β -insan koryonik gonadotropini, alfafetoproteini (AFP), lektin-reaktif AFP, tiroglobülin, RAGE-1, MN-CA IX, insan telomeraz ters transkriptaz, RU1, RU2 (AS), intestinal karboksil esteraz, mut hsp70-2, M-CSF, prostaz, prostat-spesifik antijen (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prostein, PSMA, Her2/neu, survivin ve telomeraz, prostat-karsinom tümörü antijen-1 (PCTA-1), MAGE, ELF2M, nötrofil elastaz, efrinB2, CD22, insülin büyüme faktörü (IGF)-I, IGF-II, IGF-I reseptörü ve mezotelin, içerir.

Maligne tümörler bir immün saldırı için hedef antijenler olarak görev alabilen çok sayıda protein eksprese eder. Bu moleküller, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, doku-spesifik antijenleri, örneğin, melanomda MART-1, tirozinaz ve GP 100 ve prostat kanserinde ve prostatik asit fosfataz (PAP) ve prostat-spesifik antijen (PSA) içerir. Diğer hedef moleküller, transformasyon-ilişkili moleküller grubuna, örneğin onkogen HER-2/Neu/ErbB-2, ait olabilir. Hedef antijenlerin daha başka bir grubu, onko-fetal antijenlerdir, örneğin, karsinoembriyonik antijendir (CEA). B-hücresi lenfomasında, tümör-spesifik idiyotip immünoglobülin, münferit tümöre özgü olan bir tamamen tümör-spesifik immünoglobülin antijeni oluşturur. B-hücresi farklılaşma antijenleri, örneğin, CD19, CD20 ve CD37, B-hücresi lenfomasında hedef antijenler için diğer adaylardır. Bu antijenlerin bazıları (CEA, HER-2, CD19, CD20, idiyotip), monoklonal antikolar ile sınırlı başarı ile pasif immünoterapi için hedefler olarak kullanılmıştır.

Açıklamada ifade edile tümör antijen tipi ayrıca, bir tümör-spesifik antijen (TSA) veya bir tümör-ilişkili antijen (TAA) de olabilir. Bir TSA, tümör hücrelerine özgüdür ve vücudun diğer hücreleri üzerinde bulunmaz. Antijen ile ilişkili bir TAA, bir tümör hücresine özgü değildir ve bunun yerine antijene bir immünolojik tolerans hâlini indüklemeyen koşullar altında bir normal hücre üzerinde de eksprese edilir. Tümör üzerinde antijenin ekspresyonu, immün sistemin antijene yanıt vermesine olanak sağlayan koşullar altında gerçekleşebilir. TAA'lar, immün sistem immatür olduğunda ve yanıt veremediğinde fetal gelişim sırasında normal hücreler üzerinde eksprese edilen antijenler olabilir veya bunlar normal hücreler üzerinde normalde hayli düşük düzeyler

bulunan, ancak tümör hücreleri üzerinde daha yüksek düzeylerde eksprese edilen antijenler olabilir.

TSA veya TAA antijenlerinin sınırlayıcı olmayan örnekleri aşağıdakileri içerir:

5 Farklılaşma antijenleri, örneğin, MART-1/MelanA (MART-1), gp100 (Pmel 17), tirozinaz, TRP-1, TRP-2 ve tümör-spesifik çok-soylu antijenler, örneğin, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; aşırı-eksprese edilmiş embriyonik antijenler, örneğin, CEA; aşırı-eksprese edilmiş onkogenler ve mutasyona uğratılmış tümör-süpresör genleri, örneğin, p53, Ras, HER-2/neu; kromozomal translokasyonlardan

10 kaynaklanan tümör antijenleri; örneğin, BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; ve viral antijenler, örneğin, Epstein Barr virüsü antijenleri EBVA ve insan papillomavirüsü (HPV) antijenleri E6 ve E7. Diğer büyük, protein-temelli antijenler, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-

15 met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-Katenin, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoprotein, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\p1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\Mac-2 bağlama

20 proteini\siklofilin C-ilişkili protein, TAAL6, TAG72, TLP ve TPS'yi içerir.

Burada açıklandığı üzere, diğer antijenler, CD20, CD22, ROR1, Mezotelin, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glikolipit F77, EGFRvIII, GD-2, MY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR ve benzerlerini içerir.

25 Burada tarif edildiği üzere, buluşun CAR'ının antijen bağlama kısmı parçası, CD19'u hedef alır. Tercihen, buluşun CAR'ı içindeki antijen bağlama kısmı parçası anti-CD19 scFv'dir, burada anti-CD19 scFv'nin nükleik asit dizisi, SEQ ID NO: 14'te izah edilen diziyi içerir. Alternatif olarak, anti-CD19 scFv, SEQ ID NO: 20'nin amino asit dizisini şifreleyen nükleik asit dizisini içerir. Bir başka uygulamada, buluşun CAR'ının anti-

30 CD19 scFv kısmı SEQ ID NO: 20'de izah edilen amino asit dizisini içerir.

Transmembran alan

Transmembran alana gelince, CAR, CAR'ın ekstraselüler alanına kaynaşan bir

35 transmembran alan içermesi için tasarlanabilir. Bir uygulamada, CAR içindeki alanların

biri ile doğal olarak ilişkili olan transmembran alan kullanılır. Bazı durumlarda, transmembran alan, reseptör kompleksinin diğer üyeleri ile etkileşimi minimuma indirmek için bu tarz alanların aynı veya farklı yüzey membran proteinlerinin transmembran alanlarını bağlamasını önlemek için seçilebilir veya amino asit
5 süstitüsüyle modifiye edilebilir.

Transmembran alan, bir doğal veya bir sentetik kaynaktan türetilebilir. Kaynak doğal olduğunda, alan, herhangi bir membran-bağlı veya transmembran proteinden türetilebilir. Bu buluşta özel kullanımın transmembran bölgeleri, T-hücresi reseptörü,
10 CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, alfa, beta veya zeta zincirinden türetilebilir (yani, bunların en azından transmembran bölgesini (bölgelerini) içerir). Alternatif olarak, transmembran alan sentetik olabilir, bu durumda, bu ağırlıklı olarak hidrofobik rezidüer, örneğin, lösin ve valin içerecektir. Tercihen, bir fenilalanin, triptofan ve valin üçlüsü bir
15 sentetik transmembran alanının her bir ucunda bulunacaktır. Opsiyonel olarak, tercihen 2 ila 10 amino asit uzunluğunda olan, bir kısa oligo- veya polipeptit bağlayıcı, CAR'ın transmembran alanı ve sitoplazmik sinyalleme alanı arasında bağlantı oluşturabilir. Bir glisin-serin ikilisi, özel olarak uygun bir bağlayıcı sağlar.

20 Tercihen, buluşun CAR'ı içindeki transmembran alanı, CD8 transmembran alanıdır. Bir uygulamada, CD8 transmembran alanı, SEQ ID NO: 16'nın nükleik asit dizisini içerir. Bir uygulamada, CD8 transmembran alanı, SEQ ID NO: 22'nin amino asit dizisini şifreleyen nükleik asit dizisini içerir. Bir başka uygulamada, CD8 transmembran alanı, SEQ ID NO: 22'nin amino asit dizisini içerir.

25

Bazı durumlarda, buluşun CAR'ının transmembran alanı, CD8 α menteşe alanı içerir. Bir uygulamada, CD8 menteşe alanı, SEQ ID NO: 15'in nükleik asit dizisini içerir. Bir uygulamada, CD8 menteşe alanı, SEQ ID NO: 21'in amino asit dizisini şifreleyen nükleik asit dizisini içerir. Bir başka uygulamada, CD8 menteşe alanı, SEQ ID NO: 21'in
30 amino asit dizisini içerir.

Sitoplazmik alan

Buluşun CAR'ının sitoplazmik alanı veya aksi durumda intraselüler sinyalleme alanı,
35 içine CAR'ın yerleştirildiği immün hücrenin normal efektör fonksiyonlarının en az birinin

aktivasyonundan sorumludur. "Efektör fonksiyon" terimi, bir hücrenin özelleşmiş bir fonksiyonunu ifade eder. Bir T hücrenin efektör fonksiyonu, örneğin, sitolitik aktivite veya sitokinlerin salgılanmasını içeren yardımcı aktivite olabilir. Böylelikle, "intraselüler sinyalleme alanı" terimi, bir proteinin efektör fonksiyon sinyalini ileten ve hücreyi

5 özelleşmiş bir fonksiyonu gerçekleştirmeye yönlendiren kısmını ifade eder. Genel olarak, tüm intraselüler sinyalleme alanı kullanılabilirken, çoğu durumda, tüm zinciri kullanmak gerekli değildir. İntraselüler sinyalleme alanının kırılmış bir kısmının kullanıldığı ölçüde, bu tarz kırılmış kısım, bu efektör fonksiyon sinyalini ilettiği surece aynen zincirin yerine kullanılabilir. Dolayısıyla, intraselüler sinyalleme alanı teriminin,

10 intraselüler sinyalleme alanının efektör fonksiyon sinyalini iletmek için yeterli olan kırılmış herhangi bir kısmını içermesi kastedilir.

Buluşun CAR'ı içinde kullanılması için intraselüler sinyalleme alanları, T hücresi reseptörünün (TCR) ve antijen reseptörü engajmanını takiben sinyal iletimi başlatmaya

15 uygun şekilde etki eden ko-reseptörlerin sitoplazmik dizilerini aynı zamanda bu dizilerin herhangi bir türevini veya varyantını ve burada tanımlanan ile aynı fonksiyonel yetenekliliğe sahip olan herhangi bir sentetik diziyi içerir.

Tek başına TCR yoluyla üretilen sinyallerin T hücrenin tam aktivasyonu için yetersiz olduğu ve bir sekonder veya ko-stimülatör sinyalin de gerekli olduğu bilinir. Böylelikle, T hücresi aktivasyonuna sitoplazmik sinyalleme dizisinin iki ayrı sınıfı tarafından aracılık edildiği söylenebilir: TCR (primer sitoplazmik sinyalleme dizileri) yoluyla antijen-bağımlı primer aktivasyonu başlatanlar ve bir sekonder veya ko-stimülatör sinyal (sekonder sitoplazmik sinyalleme dizileri) sağlamak için antijenden-bağımsız bir şekilde etki

20 edenler.

25

Primer sitoplazmik sinyalleme dizileri, ya bir stimülatör yolu ile ya da bir inhibitör yolu ile TCR kompleksinin primer aktivasyonunu regüle eder. Bir stimülatör şekilde etki eden primer sitoplazmik sinyalleme dizileri, immüno-reseptör tirozin-temelli aktivasyon motifleri veya ITAM'lar olarak bilinen sinyalleme motifleri içerebilir.

30

Özel kullanımı olan primer sitoplazmik sinyalleme dizileri içeren ITAM örnekleri, TCR zeta'dan, FcR gama'dan, FcR beta'dan, CD3 gama'dan, CD3 delta'dan, CD3 epsilon'dan, CD5'ten, CD22'den, CD79a'dan, CD79b'den ve CD66d'den türetilenleri

içerir. Buluşa göre, buluşun CAR'ı içindeki sitoplazmik sinyalleme molekülü, CD3 zeta'dan türetilen bir sitoplazmik sinyalleme dizisi içerir.

CAR'ın sitoplazmik alanı, 4-1BB ko-stimülatör molekülünün intraselüler alanını içeren
 5 CAR'ın bir kısmını ifade eden bir ko-stimülatör sinyalleme bölgesi ile birleştirilmiş CD3-
 zeta sinyalleme alanı içerir. Bir ko-stimülatör molekül, bir antijen reseptörü veya
 bunların bir antijene lenfositlerin etkili bir yanıtı için gerekli olan ligandları dışındaki bir
 hücre yüzeyi molekülüdür. Diğer bu tarz moleküllerin örnekleri, CD27, CD28, (CD137),
 OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, lenfosit fonksiyonu-ilişkili antijen-1 (LFA-1), CD2,
 10 CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 ve CD83 ile spesifik olarak bağlayan bir ligandı ve
 benzerlerini içerir.

Buluşun CAR'ının sitoplazmik sinyalleme kısmı içindeki sitoplazmik sinyalleme dizileri,
 bir rastgele veya belirli sırada bir diğerine bağlanabilir. Opsiyonel olarak, tercihen 2 ila
 15 10 amino asit uzunluğunda olan, bir kısa oligo- veya polipeptit bağlayıcı bağlantıyı
 oluşturabilir. Bir glisin-serin ikilisi, bir özel olarak uygun bağlayıcı sağlar.

Sitoplazmik alan, CD3-zeta'nın sinyalleme alanını ve 4-1BB'nin sinyalleme alanını
 içermesi için tasarlanır.

20

Bir uygulamada, buluşun CAR'ı içindeki sitoplazmik alan, 4-1BB'nin sinyalleme alanını
 ve CD3-zeta'nın sinyalleme alanını içermesi için tasarlanır, burada 4-1BB'nin
 sinyalleme alanı SEQ ID NO: 17'de izah edilen nükleik asit dizileri içerir ve CD3-
 zeta'nın sinyalleme alanı, SEQ ID NO: 18'de izah edilen nükleik asit dizisi içerir.

25

Bir uygulamada, buluşun CAR'ı içindeki sitoplazmik alan, 4-1BB'nin sinyalleme alanını
 ve CD3-zeta'nın sinyalleme alanını içermesi için tasarlanır, burada 4-1BB'nin
 sinyalleme alanı SEQ ID NO: 23'ün amino asit dizisini şifreleyen nükleik asit dizisini
 içerir ve CD3-zeta'nın sinyalleme alanı SEQ ID NO: 24'ün amino asit dizisini şifreleyen
 30 nükleik asit dizisini içerir.

Bir uygulamada, buluşun CAR'ı içindeki sitoplazmik alan, 4-1BB'nin sinyalleme alanını
 ve CD3-zeta'nın sinyalleme alanını içermesi için tasarlanır, burada 4-1BB'nin
 sinyalleme alanı SEQ ID NO: 23'te izah edilen amino asit dizisini içerir ve CD3-zeta'nın
 35 sinyalleme alanı SEQ ID NO: 24'te izah edilen amino asit dizisini içerir.

Vektörler

5 Mevcut açıklama, bir CAR'ın dizilerini içeren bir DNA yapısını kapsar, burada dizi, bir intraselüler alanın, yani, CD3-zeta'nın ve 4-1BB'nin intraselüler alanlarının, nükleik asit dizine operatif olarak bağlı olan bir antijen bağlama kısmının nükleik asit dizisini içerir.

10 Bir uygulamada, buluşun CAR'ı, anti-CD19 scFv, insan CD8 menteşe ve transmembran alanı ve insan 4-1BB ve CD3-zeta sinyalleme alanları içerir. Bir uygulamada, buluşun CAR'ı, SEQ ID NO: 8'de izah edilen nükleik asit dizisi içerir. Bir başka uygulamada, buluşun CAR'ı, SEQ ID NO: 12'nin amino asit dizisini şifreleyen nükleik asit dizisini içerir. Bir başka uygulamada, buluşun CAR'ı, SEQ ID NO: 12'de izah edilen amino asit dizisini içerir.

15 Arzu edilen molekülleri kodlayan nükleik asit dizileri, teknikte bilinen rekombinant yöntemler kullanılarak, örneğin, mesela, standart teknikler kullanılarak, geni eksprese eden hücrelerden kütüphaneleri tarama ile, bunu içerdiği bilinen bir vektörden geni türetme ile veya bunu içeren hücrelerden veya dokulardan doğrudan izole etme ile, elde edilebilir. Alternatif olarak, ilgili gen, klonlanmaktan ziyade sentetik olarak
20 üretilir.

Mevcut açıklama ayrıca, mevcut buluşun bir DNA'sının bunun içine yerleştirildiği vektörleri de sağlar. Retrovirüslerden, örneğin, lentivirüsten, türetilen vektörler, uzun-sürelili, kararlı bir gen entegrasyonunu ve bunun yavru hücrelere propagasyonuna izin
25 verdiği için, bunlar uzun-sürelili gen transferi başarmak için uygun araçlardır. Lentiviral vektörler, onko-retrovirüslerden, örneğin, mürin lösemi virüslerinden, türetilen vektörlere kıyasla, bunların çoğalmayan hücrelere, örneğin, hepatositlere, aktarabilmesi açısından eklenmiş avantaja sahiptir. Bunlar ayrıca, düşük immünojenisite nin eklenmiş avantajına da sahiptir.

30

Kısa özet olarak, CAR'ları şifreleyen doğal veya sentetik nükleik asitlerin ekspresyonu tipik olarak, CAR polipeptidini veya bunun kısımlarını şifreleyen bir nükleik asidi bir promotöre operatif olarak bağlama ve yapıyı bir ekspresyon vektörü bünyesine katma ile başarılıdır. Vektörler replikasyon ve entegrasyon ökaryotları için uygun olabilir. Tipik
35 klonlama vektörleri, transkripsiyon ve translasyon sonlandırıcıları, başlatma dizileri ve

arzu edilen nükleik asit dizisinin ekspresyonunun regülasyonu için yararlı olan promotörleri içerir.

Burada tarif edilen ekspresyon yapıları ayrıca, standart gen aktarım protokolleri
5 kullanılarak, nükleik asit immünizasyon ve gen terapisi için de kullanılabilir. Gen aktarımı için yöntemler teknikte bilinir. *Bakınız, örn., 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466 Numaralı US Patenti.* Bir başka uygulamada, buluş bir gen terapisi vektörü sağlar.

Nükleik asit, çok sayıda vektör tipi içine klonlanabilir. Örneğin, bunlarla sınırlı
10 kalmamak kaydıyla, bir plazmit, bir fajmit, bir faj türevi, bir hayvan virüsü ve bir kozmit, içeren bir vektör içine klonlanabilir. Özel olarak ilgilenilen vektörler, ekspresyon vektörlerini, replikasyon vektörlerini, prob üretme vektörlerini ve dizileme vektörlerini içerir.

İlaveten, ekspresyon vektörü, bir viral vektör formunda bir hücreye sağlanabilir. Viral
15 vektör teknolojisi teknikte iyi bilinir ve örneğin, Sambrook et al., (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) ve diğer viroloji ve moleküler biyoloji el-kitaplarında tarif edilir. Vektörler olarak yararlı olan virüsler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, retrovirüsleri, adenovirüsleri, adeno-ilişkili
20 virüsleri, herpes virüslerini ve lentivirüsleri içerir. Genel olarak, uygun bir vektör, en az bir organizmada fonksiyonel olarak bir replikasyon orijini, bir promotör dizisi, uygun restriksiyon endonükleaz yerleri ve bir veya birden fazla seçilebilir belirteç içerir (örn., WO 01/96584; WO 01/29058 ve 6,326,193 Numaralı US Patenti).

Çok sayıda viral temelli sistem, memeli hücreleri içine gen transfer için geliştirilmiştir.
25 Örneğin, retrovirüsler gen aktarım sistemleri için uygun bir platform sağlar. Seçilmiş bir gen, bir vektör içine yerleştirilebilir ve teknikte bilinen teknikler kullanılarak retroviral parçacıklar içinde paketlenir. Akabinde, rekombinant virüs izole edilebilir ve süjenin hücrelerine *in vivo* veya *ex vivo* aktarılabilir. Çok sayıda retroviral sistem teknikte bilinir.
30 Örneğin, adenovirüs vektörleri kullanılır. Çok sayıda adenovirüs vektörleri teknikte bilinir. Bir uygulamada, lentivirüs vektörleri kullanılır.

İlave promotör elemanları, örn., hızlandırıcılar, transkripsiyonel başlatmanın sıklığını
35 regüle eder. Tipik olarak, çok sayıda promotörün başlama yerinin downstream'ında da fonksiyonel elemanlar içerdiğinin yakın tarihlerde gösterilmiş olmasına rağmen, bunlar

başlama yerinin 30-110 bp upstream bölgesinde yer alır. Promotör elemanları arasında aralık bırakma sıklıkla esnekler, böylece elemanlar bir diğerine göre ters çevrildiğinde veya hareket ettirildiğinde, promotör fonksiyonu korunur. Timidin kinaz (tk) promotöründe, promotör elemanları arasında aralık bırakma, aktivitenin düşmeye başlamasından önce 50 bp'lik uzaklığa artırılabilir. Promotöre bağlı olarak, münferit elemanların transkripsiyonu aktive etmek için iş-birliği yaparak veya bağımsız bir şekilde işlev gösterebildiği görülür.

Uygun bir promotörün bir örneği, hemen erken sitomegalovirüs (CMV) promotörü dizisidir. Bu promotör dizisi, buna operatif olarak bağlı olan herhangi bir polinükleotid dizisinin yüksek düzeylerde ekspresyonuna yön verebilen güçlü bir konstitütif promotör dizisidir. Uygun bir promotörün bir başka örneği, Elongasyon Büyüme Faktörü-1 α 'dır (EF-1 α). Buna rağmen, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, simian virüsü 40 (SV40) erken promotörünü, fare mammary tümör virüsü (MMTV), insan immün-yetmezlik virüsü (HIV) uzun uç tekrarı (LTR) promotörünü, MoMuLV promotörünü, bir kuş lösemi virüsü promotörünü, bir Epstein-Barr virüsü hemen erken promotörünü, bir Rous sarkom virüsü promotörünü aynı zamanda insan geni promotörlerini, örneğin, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, aktin promotörünü, miyozin promotörünü, hemoglobin promotörünü ve kreatin kinaz promotörünü, içeren diğer konstitütif promotör dizileri de kullanılabilir. İlâveten, buluş konstitütif promotörlerin kullanılması ile sınırlandırılmamalıdır. İndüklenebilir promotörler de buluşun parçası olarak tasarlanır. Bir indüklenebilir promotörün kullanılması, bu tarz ekspresyon arzu edildiğinde bunun operatif olarak bağlı olduğu polinükleotid dizisinin ekspresyonunu harekete geçirebilen (açabilen) veya ekspresyon arzu edilmediğinde ekspresyonu durdurabilen (kapatabilen) bir moleküler anahtar sağlar. İndüklenebilir promotörlerin örnekleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bir metalloproteinin promotörü, bir glukokortikoid promotörü, bir progesteron promotörü ve bir tetrasiklin promotörü içerir.

Bir CAR polipeptidinin veya bunun kısımlarının ekspresyonunu değerlendirmek için, bir hücre içine uygulanacak olan ekspresyon vektörü ayrıca, viral vektörler yoluyla transfekte edilmesi veya enfekte edilmesi için araştırılan hücrelerin popülasyonundan eksprese eden hücrelerin tanımlanmasını ve seleksiyonunu kolaylaştırmak için bir seçilebilir belirteç geni veya bir röportör gen veya her ikisini de içerebilir. Diğer yönlerinde, seçilebilir belirteç ayrı bir DNA parçası üzerinde taşınabilir ve bir eş-transfeksiyon prosedüründe kullanılabilir. Hem seçilebilir belirteçlerin hem de röportör

genlerin her iki ucunda, konak hücreler içinde ekspresyona olanak sağlamak için uygun regülatör diziler yer alabilir. Uygun seçilebilir belirteçler, örneğin, antibiyotik-direnç genlerini, örneğin, neo ve benzerlerini içerir.

- 5 Röportör genler, potansiyel olarak transfekte edilmiş hücreleri tanımlamak için ve regülatör dizilerin işlevselliğini değerlendirmek için kullanılır. Genel olarak, bir röportör gen, alıcı organizma veya doku içinde bulunmayan veya bunlar tarafından eksprese edilmeyen ve ekspresyonu bazı kolaylıkla saptanabilir özellikler, öm., enzimatik aktivite, ile gösterilen bir polipeptidi şifreleyen bir genidir. Röportör genin ekspresyonu,
- 10 DNA'nın alıcı hücrelerin içine uygulanmasından sonra uygun bir zamanda analiz edilir. Uygun röportör genler, lüsiferaz, beta-galaktosidaz, kloramfenikol asetil transferaz, salgılanmış alkalın fosfataz veya yeşil flüoresan protein genini şifreleyen genleri içerebilir (örn., Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Uygun ekspresyon sistemleri iyi bilinir ve bilinen teknikler kullanılarak hazırlanabilir veya piyasadan elde
- 15 edilebilir. Genel olarak, röportör geninin ekspresyonunun en yüksek düzeyini gösteren her iki ucunda minimal 5' bölgesi olan yapı promotör olarak tanımlanır. Uygun promotör bölgeleri, bir röportör gene bağlanabilir ve promotör tarafından yön verilmiş transkripsiyonu modüle etme yetisi için ajanları değerlendirmek amacıyla kullanılabilir.
- 20 Bir hücre içine genler uygulamanın ve eksprese etmenin yöntemleri teknikte bilinir. Bir ekspresyon vektörü bağlamında, vektör, bir konak hücre, öm., memeli, bakteriyel, maya veya böcek hücresi, içine teknikteki herhangi bir yöntem ile kolaylıkla uygulanabilir. Örneğin, ekspresyon vektörü, bir konak hücre içine fiziksel, kimyasal veya biyolojik yollar ile transfer edilebilir.
- 25 Bir konak hücre içine bir polinükleotidi uygulamak için fiziksel yöntemler, kalsiyum fosfat çöktürmesini, lipofeksiyonu, parçacık bombardımanını, mikro-enjeksiyonu, elektroporasyonu ve benzerlerini içerir. Vektörler ve/veya ekzojen nükleik asitler içeren hücreler üretmek için yöntemler teknikte iyi-bilinir. Bakınız, örneğin, Sambrook et al.,
- 30 (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Bir konak hücre içine bir polinükleotidin uygulanması için tercih edilen bir yöntem, kalsiyum fosfat transfeksiyonudur.

- 35 Bir konak hücre içine söz konusu bir polinükleotidi uygulamak için biyolojik yöntemler, DNA ve RNA vektörlerinin kullanılmasını içerir. Viral vektörler ve özellikle retroviral

vektörler, genleri memeli, örneğin, insan, hücreleri içine yerleştirmek için en yaygın şekilde kullanılan yöntem hâline gelmiştir. Diğer viral vektörler, lentivirüsten, poksivirüslerden, herpes simpleks virüsü l'den, adenovirüslerden ve adeno-ilişkili virüslerden ve benzerlerinden türetilir. Bakınız, örneğin, 5,350,674 ve 5,585,362
5 Numaralı US Patentleri.

Bir konak hücre içine bir polinükleotidi uygulamak için kimyasal araçlar, koloidal dispersiyon sistemlerini, örneğin, makro-molekül komplekslerini, nano-kapsülleri, mikroküreleri, bilyeleri ve su içinde yağ emülsiyonlarını, miselleri, karma miselleri ve
10 lipozomları içeren lipit-temelli sistemleri, içerir. *In vitro* ve *in vivo* bir aktarım vehikülü olarak kullanılması için bir emsal koloidal sistem, bir lipozomdur (örn., bir yapay membran vehikülüdür).

Bir non-viral aktarım sisteminden yararlanılan durumda, bir emsal aktarım vehikülü bir
15 lipozomdur. Lipit formülasyonlarının kullanılması, bir konak hücre içine nükleik asitlerin (*in vitro*, *ex vivo* veya *in vivo*) uygulanması için tasarlanır. Bir başka yönde, nükleik asit, bir lipit ile ilişkili olabilir. Bir lipit ile ilişkili nükleik asit, bir lipozomun sulu iç kısmında enkapsüle edilebilir, bir lipozomun lipit ikili-katmanı arasına yerleştirilebilir, hem lipozom hem de oligonükleotid ile ilişkili olan bir bağlama molekülü vasıtasıyla bir lipozoma
20 eklenebilir, bir lipozom içine kısırılabilir, bir lipozom ile kompleks hâline getirilebilir, bir lipit içeren bir çözelti içine serpiştirilebilir, bir lipit ile karıştırılabilir, bir lipit ile birleştirilebilir, bir lipit içinde bir süspansiyon olarak dâhil edilebilir, bir misele dâhil edilebilir veya bir misel ile kompleks hâline getirilebilir veya aksi durumda bir lipit ile ilişkilendirilebilir. Lipit, lipit/DNA veya bileşimler il ilişkili lipit/ekspresyon vektörü, çözelti
25 içindeki herhangi bir özel yapı ile sınırlandırılmaz. Örneğin, bunlar bir ikili-katman yapısı içinde, miseller olarak, veya bir "çökmüş" yapı ile bulunabilir. Bunlar ayrıca, muhtemelen boyut ve şekil açısından tekdüze olmayan agregatlar oluşturarak, bir çözelti içine basit bir şekilde serpiştirilebilir. Lipitler doğal oluşumlu veya sentetik lipitler olabilen yağlı maddelerdir. Örneğin, lipitler, sitoplazma içinde doğal olarak bulunan
30 yağlı damlaları aynı zamanda uzun-zincirli alifatik hidrokarbonlar ve bunların türevlerini, örneğin, yağ asitlerini, alkolleri, aminleri, amino alkolleri ve aldehitleri, içeren bileşikler sınıfını içerir.

Kullanılması için uygun lipitler, ticari kaynaklardan elde edilebilir. Örneğin, dimiristil
35 fosfatidilkolin ("DMPC"), Sigma, St. Louis, MO firmasından elde edilebilir; disetil fosfat

("DCP"), K & K Laboratories (Plainview, NY) firmasından elde edilebilir; kolesterol ("Choi"), Calbiochem-Behring firmasından elde edilebilir; dimiristil fosfatidilgliserol ("DMPG") ve diğer lipitler Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL) firmasından elde edilebilir. Kloroform veya kloroform/metanol içindeki lipitlerin stok çözeltileri, yaklaşık -
 5 20°C'de saklanabilir. Kloroform, metanole kıyasla daha kolay buharlaştığından, tek çözücü olarak kullanılır. "Lipozom", çeşitli tekli ve etrafı sarılmış lipit ikili-katmanlarının ve agregatların üretilmesi ile oluşturulan çoklu-lameller lipit vehikülleri kapsayan bir jenerik terimdir. Lipozomlar, bir fosfolipit ikili-katman membranı ve bir iç sulu vasatı olan veziküler yapılara sahip olma ile karakterize edilebilir. Çoklu-lameller lipozomlar, sulu
 10 vasat ile ayrılmış çoklu lipit katmanlarına sahiptir. Fosfolipitler fazla miktardaki bir sulu çözelti içinde süspanse edildiğinde, bunlar kendiliğinden oluşur. Lipit bileşenleri, etrafı sarılmış yapıların oluşmasından önce kendi kendine yeniden-düzenlenme geçirir suyu ve çözünmüş maddeleri lipit ikili-katmanları arasında kısıtır (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). Buna rağmen, normal veziküler yapıya kıyasla çözelti içinde
 15 farklı yapılara sahip olan bileşimler de kapsanır. Örneğin, lipitler bir miseller yapı varsayabilir veya yalnızca lipit moleküllerinin tekdüze olmayan agregatları olarak var olabilir. Lipofektamin-nükleik asit kompleksleri de tasarlanır.

Bir konak hücre içine ekzojen nükleik asitleri uygulamak veya diğer durumda bir
 20 hücreyi mevcut buluşun inhibitörüne maruz bırakmak için kullanılan yöntemle bakılmaksızın, konak hücre içinde rekombinant DNA dizisinin varlığını doğrulamak için, çeşitli analizler yapılabilir. Bu tarz analizler, örneğin, teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından iyi bilinen "moleküler biyoloji" analizlerini, örneğin, Southern ve Northern blotlamayı, RT-PCR'ı ve PCR'ı; "biyokimyasal" analizleri, örneğin, özel bir peptidin
 25 varlığını veya yokluğunu, örn., immünolojik araçlar (ELİZA'lar ve Western blotlar) ile buluşun kapsamı içinde yer alan ajanları tanımlamak için burada tarif edilen analizler ile, saptamayı, içerir.

T hücrelerinin kaynakları

30

Burada tarif edilen T hücrelerinin genişlemesinden ve genetik modifikasyonundan önce, T hücrelerinin bir kaynağı, bir süjeden elde edilir. T hücreleri, periferik kan mononükleer hücrelerini, kemik iliğini, lenf nodu dokusunu, kordon kanını, timüs dokusunu, bir enfeksiyon yerinden dokuyu, asitleri, plevral efüzyonu, dalak dokusunu
 35 ve tümörleri içeren çeşitli kaynaklardan elde edilebilir. Burada tarif edildiği üzere,

teknikte mevcut olan çok sayıdaki T hücresi hattı kullanılabilir. T hücreleri, bir süjeden uzmanlığı olan kişi tarafından bilinen herhangi bir sayıdaki teknik, örneğin, Ficoll™ ayırması, kullanılarak toplanan bir kan biriminden elde edilebilir. Bir bireyin dolaşımındaki kanından elde edilen hücreler aferez ile elde edilir. Aferez ürünü tipik olarak, T hücrelerini, monositleri, granülositleri, B hücrelerini, diğer çekirdekli beyaz kan hücrelerini içeren lenfositleri, kırmızı kan hücrelerini ve plateletleri içerir. Aferez ile toplanan hücreler, plazma fraksiyonunu uzaklaştırmak ve hücreleri müteakip işleme adımları için uygun bir tampon veya vasat içinde yerleştirmek için yıkanabilir. Hücreler fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanır. Alternatif olarak, yıkama çözeltisi, kalsiyumdan yoksundur ve magnezyumdan yoksun olabilir veya tümünden olmasa da çoğu iki-değerlikli katyondan yoksun olabilir. Yine, sürpriz bir şekilde, kalsiyum varlığında başlangıç aktivasyon adımları, büyütülmüş aktivasyona yol açar. Teknikte normal uzmanlığı olan kişilerin kolaylıkla anlayacağı üzere, bir yıkama adımı, teknikte bilinen yöntemler, örneğin, üreticinin talimatlarına göre bir yarı-otomatikleştirilmiş "sürekli-akış" sentrifüjü (örneğin, Cobe 2991 hücre işleyici, Baxter CytoMate veya Haemonetics Cell Saver 5) kullanılması ile tamamlanabilir. Yıkamadan sonra, hücreler çeşitli biyo-uyumlu tamponlar, örneğin, mesela, Ca²⁺-içermeyen, Mg²⁺-içermeyen PBS, PlasmaLyte A veya tampon içeren veya içermeyen başka salin çözeltisi, içinde yeniden-süspanse edilebilir. Alternatif olarak, aferez örneğinin istenmeyen bileşenleri uzaklaştırılabilir ve hücreler doğrudan kültür vasatları içinde yeniden-süspanse edilebilir.

Burada tarif edildiği üzere, T hücreleri, kırmızı kan hücrelerini lize etme ve monositleri tüketme ile, örneğin, bir PERCOLL™ gradyanı yoluyla sentrifügasyon ile veya karşı-akış sentrifügal yıkayarak ayırma ile, periferik kan lenfositlerinden izole edilir. T hücrelerinin spesifik bir alt-popülasyonu, örneğin, CD3⁺, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ ve CD45RO⁺ T hücreleri, pozitif veya negatif seleksiyon teknikleri ile ilaveten izole edilebilir. Örneğin, T hücreleri, anti-CD3/anti-CD28 (yani, 3x28)-konjugat bilyeler, örneğin, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, ile arzu edilen T hücrelerinin pozitif seleksiyonu için yeterli bir zaman periyodu, örn., yaklaşık 30 dakikalık bir periyot, 30 dakika ila 36 saat aralığındaki zaman periyodu veya daha uzun süre ve bunlar arasındaki tüm tam sayı değerler boyunca inkübasyon ile izole edilir, zaman periyodu en az 1, 2, 3, 4, 5 veya 6 saattir, zaman periyodu 10 ila 24 saattir veya inkübasyon zaman periyodu, 24 saattir. Lösemisi olan hastalardan T hücrelerinin izolasyonu için, daha uzun inkübasyon sürelerinin, örneğin, 24 saatin, kullanılması, hücre verimini artırabilir. Daha uzun inkübasyon süreleri, T hücrelerini, diğer hücre tiplerine kıyasla bir

kaç T hücrelerinin olduğu herhangi bir durumda, örneğin, tümör infiltrate eden lenfositleri (TIL) tümör dokusundan veya immün-yetmezliği olan bireylerden izole etmede, izole etmek için kullanılabilir. İlaveten, daha uzun inkübasyon sürelerinin kullanılması CD8+ T hücrelerinin yakalanmasının etkililiğini arttırabilir. Böylelikle, basit bir şekilde süreyi 5 kısaltarak veya uzatarak, T hücrelerinin CD3/CD28 bilyelerini bağlamasına izin verilir ve/veya bilyelerin T hücrelerine oranını (ilaveten burada tarif edildiği üzere) artırma veya düşürme ile, T hücrelerinin alt-popülasyonları proses sırasında kültür başlatılmasında veya diğer zaman noktalarında tercihli bir şekilde bunlar için veya bunlara karşı seçilebilir. İlave olarak, bilyeler veya başka yüzey üzerindeki anti-CD3 10 ve/veya anti-CD28 antikolarının oranını artırma veya düşürme ile, T hücrelerinin alt-popülasyonları, kültür başlatılmasında veya arzu edilen diğer zaman noktalarında tercihli bir şekilde bunlar için veya bunlara karşı seçilebilir. Uzmanlığı olan kişi, seleksiyonun çoklu turlarının da kullanılabileceğini fark edecektir. Seleksiyon prosedürünü gerçekleştirmek ve "seçilmemiş" hücreleri aktivasyon ve genişleme 15 prosesinde kullanmak arzu edilebilir. "Seçilmemiş" hücreler ayrıca, ilave seleksiyon turlarına da tabi tutulabilir.

Bir T hücresi popülasyonunun negatif seleksiyon ile zenginleştirilmesi, negatif olarak seçilmiş hücelere özgü olan yüzey belirteçlerine yönlendirilmiş antikoların bir 20 kombinasyonu ile tamamlanabilir. Bir yöntem, hücre ayırmadır ve/veya negatif manyetik immüno-yapışma veya negatif olarak seçilmiş hücrelerin üzerinde bulunan hücre yüzeyi belirteçlerine yönlendirilmiş bir monoklonal antikor kokteyli kullanan akış sitometrisi vasıtasıyla seleksiyondur. Örneğin, CD4⁺ hücreleri açısından negatif seleksiyon ile zenginleştirmek için, bir monoklonal antikor kokteyli tipik olarak, CD14, 25 CD20, CD11b, CD16, HLA-DR ve CD8 için antikolar içerir. Tipik olarak CD4⁺, CD25⁺, CD62L^{hi}, GTR⁺ ve FoxP3⁺ eksprese eden regülatör T hücreleri açısından zenginleştirmek veya bunlar için pozitif olarak seçmek arzu edilebilir. Alternatif olarak, T regülatör hücreleri, anti-CD25 konjugat bilyeleri veya başka benzer seleksiyon yöntemi ile tüketilir.

30

Hücrelerin arzu edilen bir popülasyonunun pozitif veya negatif seleksiyon ile izolasyonu için, hücrelerin konsantrasyonu ve yüzey (örn., parçacıklar, örneğin, bilyeler) çeşitlendirilebilir. Hücrelerin ve bilyelerin maksimum temasını garanti etmek için, bilyelerin ve hücrelerin bunun içinde birlikte karıştırıldığı hacmi anlamlı bir şekilde 35 düşürmek (*yani*, hücrelerin konsantrasyonunu arttırmak) arzu edilebilir. Örneğin, 2

milyar hücre/ml olan bir konsantrasyon kullanılır, 1 milyar hücre/ml olan bir konsantrasyon kullanılır, 100 milyon hücre/ml'den fazlası kullanılır, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 veya 50 milyon hücre/ml olan bir hücre konsantrasyonu kullanılır, 75, 80, 85, 90, 95 veya 100 milyon hücre/ml'den bir hücre konsantrasyonu kullanılır veya 125 veya 150 milyon hücre/ml olan konsantrasyonlar kullanılabilir. Yüksek konsantrasyonlar kullanma, artmış hücre verimi, hücre aktivasyonu ve hücre genişlemesi ile sonuçlanabilir. İlaveten, yüksek hücre konsantrasyonları kullanma, söz konusu hedef antijenleri zayıf bir şekilde eksprese edebilen veya çoğu tümör hücresinin bulunduğu örneklerden (*yani*, lösemik kandan, tümör dokusundan, *vb.*) elde edilen hücrelerin, örneğin, CD28-negatif T hücrelerinin, daha etkili yakalanmasına olanak sağlar. Hücrelerin bu tarz popülasyonları, terapötik değere sahip olabilir ve elde etmek arzu edilecektir. Örneğin, hücrelerin yüksek konsantrasyonunu kullanma, normalde daha zayıf CD28 ekspresyonuna sahip olan CD8⁺ T hücrelerinin daha etkili seleksiyonuna olanak sağlar.

15

Hücrelerin daha düşük konsantrasyonlarını kullanmak arzu edilebilir. T hücrelerinin ve yüzeyin (*örn.*, parçacıkların, örneğin, bilyelerin) karışımını anlamlı olarak seyreltme ile, parçacıklar ve hücreler arasındaki etkileşimler minimuma indirilebilir. Bu, parçacıklara bağlı olan arzu edilen antijenlerin yüksek miktarlarını eksprese eden hücreleri seçer. Örneğin, CD4⁺ T hücreleri, yüksek düzeylerde CD28 eksprese eder ve seyreltme konsantrasyonlarında CD8⁺ T hücrelerine kıyasla daha etkili bir yakalanır, *örn.*, kullanılan hücrelerin konsantrasyonu, 5×10^6 /ml'dir veya kullanılan konsantrasyon, yaklaşık 1×10^5 /ml ile 1×10^6 /ml aralığında ve arasındaki herhangi bir tam sayı değerinde olabilir.

25

Diğer uygulamalarda, hücreler 2-10°C'de veya oda sıcaklığında çeşitli zaman uzunlukları boyunca ve çeşitli hızlarda bir rotatör üzerinde inkübe edilebilir.

Stimülasyon için T hücreleri ayrıca, bir yıkama adımından sonra da dondurulabilir. Teori tarafından sınırlandırılmadan, dondurma ve müteakip don çözme adımı, hücre popülasyonu içinde granülositleri ve bir dereceye kadar monositleri uzaklaştırma ile daha tekdüze bir ürün sağlar. Plazmayı ve plateletleri uzaklaştıran yıkama adımından sonra, hücreler bir dondurma çözeltisi içinde süspanse edilebilir. Çoğu dondurma çözeltisi ve parametreleri teknikte bilinirken ve bu bağlamda yarar olacakken, bir yöntem %20 DMSO ve %8 insan serum albümini içeren PBS veya %10 Dekstran 40 ve

35

5 %5 Dekstroz, %20 İnsan Serum Albümini ve %7,5 DMSO veya %31,25 Plazmalit-A, %31,25 Dekstroz %5, %0,45 NaCl, %10 Dekstran 40 ve %5 Dekstroz, %20 İnsan Serum Albümini ve %7,5 DMSO içeren kültür vasatları veya örneğin, Hespan ve PlasmaLyte A içeren başka uygun hücre dondurma vasatları kullanmayı içerir, akabinde hücreler -80°C'de dakikada 1° olan bir hızda dondurulur ve bir sıvı nitrojen saklama tankının buhar fazı içinde saklanır. Kontrol edilmiş dondurmanın diğer yöntemleri aynı zamanda -20°C'de veya sıvı nitrojen içinde kontrol edilmemiş hemen dondurma kullanılabilir.

10 Dondurarak-saklanmış hücrelerin buzu çözülür ve burada tarif edildiği şekilde yıkanır ve mevcut buluşun yöntemleri kullanılarak aktivasyondan önce oda sıcaklığında bir saat dinlenmeye bırakılır.

Burada tarif edildiği üzere, T hücreleri, genişletilebilir, dondurulabilir ve daha sonraki bir zamanda kullanılabilir. Burada tarif edildiği üzere, örnekler burada tarif edildiği üzere 15 özel bir hastalık tanısından kısa bir sürede sonra ancak herhangi bir tedaviden önce bir hastada toplanır. Hücreler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, ajanlar, örneğin, natalizumab, efalizumab, antiviral ajanlar, kemoterapi, radyasyon, immünosüpresif ajanlar, örneğin, siklosporin, azatiyoprin, metotreksat, mikofenolat ve FK506, antikolar veya diğer immüno-ablatif ajanlar, örneğin, CAMPATH, anti-CD3 antikolar, sitoksan, 20 fludarabin, siklosporin, FK506, rapamisin, mikofenolik asit, steroidler, FR901228 ve irradasyon ile tedaviyi içeren çok sayıda ilgili tedavi modalitesinden önce bir süreden bir kan örneğinden veya bir aferezden izole edilir. Bu ilaçlar kalsiyum bağımlı fosfataz kalsinörini (siklosporin ve FK506) inhibe eder veya büyüme faktörü indüklü sinyalleme (rapamisin) için önemli olan p70S6 kinazını inhibe eder (Liu et al., Cell 66:807-815, 25 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). Hücreler, bir hasta için izole edilir ve kemik iliği veya kök hücre nakli, kemoterapi ajanları, örneğin, fludarabin, dış-bilye radyasyon terapisi (XRT), siklofosfamid veya antikolar, örneğin, OKT3 veya CAMPATH, kullanılan T hücresi ablatif terapi ile bağlantılı olarak (örn., öncesinde, eş-zamanlı olarak veya sonrasında) 30 daha sonra kullanılması için dondurulur. Burada tarif edildiği üzere, hücreler öncesinde izole edilir ve B-hücresi ablatif terapisini, örneğin, CD20, *örn.*, Rituksan, ile reaksiyona giren ajanları, takiben tedavi amacıyla daha sonra kullanılması için dondurulabilir.

Burada açıklandığı üzere ayrıca, T hücreleri bir hastadan tedaviyi takiben doğrudan 35 elde edilir. Bu bağlamda, belirli kanser tedavilerini, özellikle immün sisteme zarar veren

ilaçlar ile tedavileri, takiben, hastaların normal olarak tedaviden geri-kazanılacağı periyot sırasında tedaviden kısa bir süre sonra, elde edilen T hücrelerinin kalitesi, optimal olabilir veya bunların *ex vivo* genişleme yetisi için iyileştirilebilir. Benzer şekilde, burada tarif edilen yöntemler kullanılarak *ex vivo* manipülasyonu takiben, bu hücreler

5 güçlendirilmiş yamanma ve *in vivo* genişleme için tercih edilen bir hâlde olabilir. Böylelikle, bu geri-kazanım fazı sırasında T hücrelerini, dentritik hücreleri veya hematopoietik soyun diğer hücrelerini içeren kan hücrelerini toplamak mevcut buluşun bağlamı içinde tasarlanır. İlaveten, mobilizasyon (örneğin, GM-CSF ile mobilizasyon) ve koşullandırma rejimleri bir süje içinde bir koşul oluşturmak için kullanılabilir, burada

10 özel hücre tiplerinin yeniden-popülasyonu, yeniden-dolaşımı, yeniden-üretimi ve/veya genişlemesi, özellikle terapiyi takiben tanımlanmış bir zaman penceresi sırasında avantajlıdır. Açıklayıcı hücre tipleri, T hücrelerini, B hücrelerini, dentritik hücreleri ve immün sistemin diğer hücrelerini içerir.

15 **T Hücrelerinin Aktivasyonu ve Genişlemesi**

Arzu edilebilir bir CAR eksprese etmesi için T hücrelerinin genetik modifikasyonundan önce veya sonra, T hücreleri, örneğin, 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566;

20 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041 Numaralı US Patentlerinde ve 20060121005 Numaralı US Patent Başvurusu Yayınında, tarif edilen yöntemler kullanılarak genel olarak aktive edilebilir ve genişletilebilir.

Genel olarak, burada tarif edilen T hücreleri, bir CD3/TCR kompleksi ilişkili sinyali

25 stimüle eden bir ajanı ve T hücrelerinin yüzeyi üzerindeki bir ko-stimülatör molekülü stimüle eden bir ligandı buna eklenmiş olan bir yüzey ile temas ettirme ile genişletilir. Özel olarak, T hücresi popülasyonları burada tarif edildiği şekilde, örneğin, bir kalsiyum iyonofor ile bağlantılı olarak, bir anti-CD3 antikoru veya bunun antijen-bağlama fragmanı veya bir yüzey üzerinde immobilize edilmiş bir anti-CD2 antikoru ile temas

30 veya bir protein kinaz C aktivatörü (örn., bryostatın) ile temas ile, stimüle edilebilir. T hücrelerinin yüzeyi üzerindeki bir aksesuar molekülünün ko-stimülasyonu için, aksesuar molekülü bağlayan bir ligand kullanılır. Örneğin, T hücrelerinin bir popülasyonu, T hücrelerinin proliferasyonunu stimüle etmek için uygun koşullar altında, bir anti-CD3 antikoru ve bir anti-CD28 antikoru ile temas ettirilebilir. CD4⁺ T hücrelerinin

35 veya CD8⁺ T hücrelerinin proliferasyonunu stimüle etmek için, bir anti-CD3 antikoru ve

5 bir anti-CD28 antikorunu. Bir anti-CD28 antikorunun örnekleri, 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacclone, Besançon, France) içerir, teknikte yaygın bir şekilde bilinen diğer yöntemler olarak kullanılabilir (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

10 T hücresi için primer stimülatör sinyal ve ko-stimülatör sinyal, farklı protokoller ile sağlanabilir. Örneğin, her bir sinyali sağlayan ajanlar çözelti içinde olabilir veya bir yüzeye kuple edilebilir. Bir yüzeye kuple edildiğinde, ajanlar aynı yüzeye (*yani*, "cis" oluşumunda) veya ayrı yüzeylere (*yani*, "trans" oluşumunda) kuple edilebilir. Alternatif olarak, bir ajan bir yüzeye kuple edilebilir ve diğer ajan çözelti içindedir. Örneğin, ko-stimülatör sinyal sağlayan ajan bir hücre yüzeyine bağlanır ve primer aktivasyon sinyali sağlayan ajan çözelti içindedir veya bir yüzeye kuple edilir veya her iki ajan da çözelti içinde olabilir. Alternatif olarak, ajanlar çözünebilir form içinde olabilir ve akabinde bir yüzeye, örneğin, Fc reseptörleri eksprese eden bir hücreye veya bir antikora veya 15 ajanları bağlayacak olan diğer bağlama ajanına çapraz-bağlanabilir. Bu bağlamda, bakınız, örneğin, T hücrelerini aktive etmede ve genişletmede kullanılması için tasarlanan yapay antijen sunan hücreler (aAPC'ler) için 20040101519 ve 20060034810 Numaralı US Patent Başvurusu Yayını.

20 Burada açıklandığı üzere, iki ajan bilyeler üzerine, aynı bilye üzerine *yani*, "cis" veya ayrı bilyelere, *yani*, "trans" immobilize edilir. Örnek olarak, primer aktivasyon sinyali sağlayan ajan, bir anti-CD3 antikorudur ve bunun bir antijen-bağlama fragmanıdır ve ko-stimülatör sinyal sağlayan ajan, bir anti-CD28 antikorudur veya bunun antijen-bağlama fragmanıdır; ve her iki ajan eş-değer moleküler miktarlarda aynı bilyeye 25 birlikte-immobilize edilir. Örneğin, CD4+ T hücresi genişlemesi ve T hücresi büyümesi için bilyelere bağlı olan her bir antikorun 1:1'lik bir oranı kullanılır. Bazı durumlara, bilyelere bağlı olan bir anti CD3:CD28 antikorları oranı kullanılır, böylece 1:1'lik bir oran kullanılarak gözlenen genişlemeye kıyasla T hücresi genişlemesinde bir artış gözlenir. 30 1:1'lik bir oran kullanılarak gözlenen genişlemeye kıyasla yaklaşık 1 ila yaklaşık 3 katlık bir artış gözlenir. Bilyelere bağlı olan CD3:CD28 antikorunun oranı 100:1 ila 1:100 aralığındadır ve bunların arasındaki tüm tam sayı değerlerdir. Bir durumda, anti-CD3 antikora kıyasla daha çok anti-CD28 antikorunu parçacıklara bağlanır, *yani*, CD3:CD28 oranı, birden azdır. Bazı durumlarda, bilyelere bağlı olan anti-CD28 antikorunun anti 35 CD3 antikoruna oranı 2:1'den büyüktür. Örneğin, bilyelere bağlı olan antikorun

1:100'lük bir CD3:CD28 oranı kullanılır, bilyelere bağlı olan antikorun 1:75'lik bir CD3:CD28 oranı kullanılır, bilyelere bağlı olan antikorun 1:50'lik bir CD3:CD28 oranı kullanılır, bilyelere bağlı olan antikorun 1:30'luk bir CD3:CD28 oranı kullanılır, bilyelere bağlı olan antikorun 1:10'luk bir CD3:CD28 oranı kullanılır veya bilyelere bağlı olan antikorun 1:3'lük bir CD3:CD28 oranı kullanılır. Alternatif olarak, bilyelere bağlı olan antikorun 3:1'lik bir CD3:CD28 oranı kullanılır.

Parçacıkların hücrelere 1:500 ila 500:1 ve bunlar arasındaki herhangi bir tam sayı değerdeki oranları T hücreleri veya diğer hedef hücreleri stimüle etmek için kullanılabilir. Teknikte normal uzmanlığı olan kişilerin kolaylıkla anlayacağı üzere, parçacıkların hücrelere oranı, hedef hücreye göre parçacık boyutuna bağlı olabilir. Örneğin, küçük boyutlu bilyeler yalnızca bir kaç hücreyi bağlayabilirken, daha büyük bilyeler daha çoğunu bağlayabilir. Hücrelerin parçacıklara oranı 1:100 ila 100:1 aralığındadır ve bunlar arasındaki herhangi bir tam sayı değerdir ve ilave uygulamalarda, 1:9 ila 9:1'i ve bunlar arasındaki herhangi bir tam sayı değeri içeren oran da T hücreleri stimüle etmek için kullanılabilir. Parçacıklara kuple edilmiş anti-CD3 ve anti-CD28'in T hücrelerine T hücresi stimülasyonu ile sonuçlanan oranı yukarıda bildirildiği şekilde çeşitlilik gösterebilir, buna rağmen, tercih edilen belirli değerler, tercih edilen bir oranın en az 1:1 parçacık:T hücresi olması ile, 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 ve 15:1'i içerir. Alternatif olarak, parçacıkların hücrelere 1:1 veya daha az olan bir oranı kullanılır. Tercih edilen bir parçacık:hücre oranı, 1:5'tir. Parçacıkların hücrelere oranı stimülasyon gününe bağlı olarak çeşitlilik gösterebilir. Örneğin, parçacıkların hücrelere oranı, birinci günde 1:1 ila 10:1 aralığındadır ve ilave parçacıklar her gün veya iki günde bir bundan sonra en fazla 10 güne kadar, (eklenme günündeki hücre sayılarına göre) 1:1 ila 1:10 olan nihai oranlarda, hücrelere eklenir. Alternatif olarak, parçacıkların hücrelere oranı, stimülasyonun birinci gününde 1:1'dir ve stimülasyonun üçüncü ve beşinci günlerinde 1:5'e ayarlanır. Bir başka durumda, parçacıklar günlük veya iki günde bir olan bir temelde birinci günde 1:1'lik ve stimülasyonun üçüncü ve beşinci günlerinde 1:5'lik bir nihai oran için eklenir. Bir başka durumda, parçacıkların hücrelere oranı stimülasyonun birinci gününde 2:1'dir ve stimülasyonun üçüncü ve beşinci gününde 1:10'a ayarlanır. Bir başka durumda, parçacıklar günlük veya iki günde bir olan bir temelde birinci günde 1:1'lik ve stimülasyonun üçüncü ve beşinci günlerinde 1:10'luk bir nihai oran için eklenir. Teknikte uzmanlığı olan biri, çeşitli diğer oranların

mevcut buluşta kullanılması için uygun olabildiğini anlayacaktır. Özellikle, oranlar parçacık boyutuna ve hücre boyutuna ve tipine bağlı olarak çeşitlilik gösterecektir.

5 Burada tarif edildiği üzere ayrıca, hücreler, örneğin, T hücreleri, ajan-kaplı bilyeler ile birleştirilir, bilyeler ve hücreler müteakiben ayrılır ve akabinde hücreler kültürlenir. Bir alternatif olarak, kültürden önce, ajan-kaplı bilyeler ve hücreler ayrılmaz, ancak birlikte kültürlenir. İlave bir durumda, bilyeler ve hücreler ilk olarak bir kuvvet, örneğin, bir manyetik kuvvet, uygulanması ile konsantre edilir, bu hücre yüzeyi belirteçlerinin artmış ligasyonu, böylece hücre stimülasyonunu indüklemekle, ile sonuçlanır.

10

Örnek olarak, hücre yüzeyi proteinleri, anti-CD3 ve anti-CD28'in buna eklendiği paramanyetik bilyelerin (3x28 bilye) T hücrelerine temas etmesine olanak sağlama ile birleştirilebilir. Bir uygulamada, hücreler (örneğin, 104 ila 109 T hücresi) ve bilyeler (örneğin, 1:1'lik bir orandaki DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T paramanyetik bilyeleri)

15 bir tampon, tercihen (iki-değerlikli katyonlar, örneğin, kalsiyum ve magnezyum, içermeyen) PBS, içinde birleştirilir. Yine, teknikte normal uzmanlığı olan kişiler herhangi bir hücre konsantrasyonunun kullanılabilirliğini kolaylıkla anlayabilir. Örneğin, hedef hücre örnek içinde çok seyrek olabilir ve örneğin yalnızca %0,01'ini içerebilir veya tüm örnek (*yani*, %100), söz konusu hedef hücreyi içerebilir. Bu doğrultuda, herhangi bir

20 hücre sayısı, mevcut buluşun bağlamı içindedir. Hücrelerin ve parçacıkların maksimum temasını garanti etmek için, parçacıkların ve hücrelerin içinde birlikte karıştırıldığı hacmi anlamlı derecede düşürmek (*yani*, hücrelerin konsantrasyonunu arttırmak) arzu edilebilir. Örneğin, yaklaşık 2 milyar hücre/ml'lik bir konsantrasyon kullanılır. Bir başka durumda, 100 milyon hücre/ml'den yüksek konsantrasyon kullanılır. İlave bir durumda,

25 hücrelerin 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 veya 50 milyon hücre/ml olan bir konsantrasyonu kullanılır. Daha başka bir durumda, 75, 80, 85, 90, 95 veya 100 milyon hücre/ml'den bir hücre konsantrasyonu kullanılır. İlave durumlarda, 125 veya 150 milyon hücre/ml olan konsantrasyonlar kullanılabilir. Yüksek konsantrasyonlar kullanma, artmış hücre verimi, hücre aktivasyonu ve hücre genişlemesi ile

30 sonuçlanabilir. İlaveten, yüksek hücre konsantrasyonlarının kullanılması söz konusu hedef antijenleri zayıf bir şekilde ekspres edebilen hücrelerin, örneğin, CD28-negatif T hücrelerinin, daha etkili yakalanmasına olanak sağlar. Hücrelerin bu tarz popülasyonları, terapötik değere sahip olabilir ve belirli uygulamalarda bunu elde etmek arzu edilecektir. Örneğin, hücrelerin yüksek konsantrasyonlarını kullanma normalde

daha zayıf CD28 ekspresyonuna sahip olan CD8+ T hücrelerinin daha etkili seleksiyonuna olanak sağlar.

Karışım, bir kaç saat (yaklaşık 3 saat) ila yaklaşık 14 gün veya bunlar arasındaki herhangi bir tam sayı olan saat kadar, kültürlenebilir. Karışım, 21 gün boyunca kültürlenebilir. Bir durumda, bilyeler ve T hücreleri yaklaşık sekiz gün boyunca birlikte kültürlenir. Bir başka durumda, bilyeler ve T hücreleri 2-3 gün boyunca birlikte kültürlenir. Stimülasyonun bir kaç siklusu da arzu edilebilir, böylece T hücrelerinin kültür süresi 60 gün veya daha uzun olabilir. T hücresi kültürü için uygun koşullar, proliferasyon ve viabilite için elzem olan faktörleri içerebilen, serum (örn., fetal bovin veya insan serumu), interlökin-2 (IL-2), insülin, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β ve TNF- α ve hücrelerin büyümesi için uzman kişi tarafından bilinen başka herhangi bir katkı maddesini içeren, uygun bir vasatı (örn., Minimal Esansiyel Vasat veya RPMI Vasatı 1640 veya X-vivo 15, (Lonza)) içerir. Hücrelerin büyümesi için diğer katkı maddeleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, sürfaktan, plazmanat ve indirgeme ajanları, örneğin, N-asetil-sistein ve 2-merkaptetanol, içerir. Vasat, eklenmiş amino asitler, sodyum pirüvat ve vitaminler ile serumsuz veya uygun bir miktardaki serum (veya plazma) veya tanımlanmış bir hormon seti ve/veya T hücrelerinin büyümesi ve genişlemesi için yeterli bir miktarda sitokin (sitokinler) ile takviye edilmiş RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 ve X-Vivo 20, Optimize edici içerebilir. Antibiyotikler, örn., penisilin ve streptomisin, yalnızca deneysel kültürlerle dâhil edilir, bir süje içine infüze edilecek olan hücrelerin kültürüne dâhil edilmez. Hedef hücreler, büyümeyi desteklemek için elzem olan koşullar, örneğin, uygun bir sıcaklık (örn., 37°C) ve atmosfer (örn., hava artı %5 CO₂), altında idame ettirilir.

25

Çeşitli stimülasyon surelerine maruz bırakılmış T hücreleri farklı karakteristikler gösterebilir. Örneğin, tipik kan ve aferez edilmiş periferik kan mononükleer hücre ürünleri, sitotoksik veya supresör T hücresi popülasyonuna (T_C, CD8⁺) kıyasla daha büyük olan bir yardımcı T hücresi popülasyonuna (T_H, CD4⁺) sahiptir. T hücrelerin CD3 ve CD28 reseptörlerini stimüle etme ile *ex vivo* genişlemesi, yaklaşık 8-9 gün önce ağırlıklı olarak T_H hücrelerin oluşan bir T hücresi popülasyonunu üretirken, yaklaşık 8-9 gün sonra, T hücresi popülasyonu, T_C hücrelerinin giderek artan bir oradan daha büyük bir popülasyonunu içerir. Bu doğrultuda, tedavinin amacına bağlı olarak, bir süjeyi ağırlıklı olarak T_H hücrelerini içeren bir T hücresi popülasyonu ile infüze etme avantajlı

30

olabilir. benzer şekilde, T_C hücrelerinin bir antijen-spesifik alt-kümesi izole edildiğinde, bu, bu alt-kümeyle daha büyük bir dereceye genişletmek için yararlı olabilir.

5 İlaveten, CD4 ve CD8 belirteçlerine ek olarak, diğer fenotipik belirteçler hücre genişlemesi prosesi süreci sırasında, anlamlı olarak, ancak büyük kısmında, yeniden-üretilebilir bir şekilde çeşitlilik gösterir. Böylelikle, bu tarz yeniden-üretilebilirlik, bir aktive edilmiş T hücresi ürününü spesifik amaçlar için uygun hâle getirme yetisine olanak sağlar.

10 Terapötik Uygulama

Burada, bir lentiviral vektör (LV) ile aktarılmış bir hücre (örn., T hücresi) tarif edilir. Örneğin, LV, bir spesifik antikorun bir antijen tanıma alanını bir CD3-zeta ve 4-1BB intraselüler alanı ile birleştiren bir CAR'ı şifreler. Böylelikle, bazı durumlarda, aktarılmış
15 T hücresi, bir CAR-aracılı T-hücresi yanıtını meydana getirir.

Buluş, bir primer T hücresinin özgüllüğünü bir tümör antijenine yeniden-yönlendirmek için istemlerde tanımlandığı üzere bir CAR kullanılmasını sağlar. Böylelikle, ayrıca, bir memelide bir hedef hücre popülasyonuna veya dokusuna bir T hücresi-aracılı immün
20 yanıtı stimüle etmek için memeliye bir CAR eksprese eden bir T hücresini uygulama adımını içeren bir yöntem de açıklanır, burada CAR, önceden belirlenmiş bir hedef ile spesifik olarak etkileşime giren bir bağlama kısmı, örneğin, intraselüler insan CD3-zeta alanı içeren bir zeta zinciri kısmı ve bir ko-stimülatör sinyalleme alanı içerir.

25 Burada, T hücrelerine bir CAR eksprese etmesi için genetik olarak mühendislik uygulanan ve CAR T hücresinin buna ihtiyacı olan bir alıcıya infüze edildiği bir hücresel terapiyi tipi açıklanır. Infüze edilmiş hücre alıcıdaki tümör hücrelerini öldürebilir. Antikor terapilerinden farklı olarak, CAR T hücreleri, sürdürülmüş tümör kontrolüne olanak sağlayabilen, uzun-sürelili devamlılık ile sonuçlanarak, *in vivo* çoğalabilir.

30

Burada tarif edilen CAR T hücreleri, güçlü *in vivo* T hücresi gelişmesini geçirebilir ve uzatılmış bir zaman boyunca kalmaya devam edebilir. Bir başka uygulamada, burada tarif edilen CAR T hücreleri, herhangi bir ilave tümör oluşumunu veya büyümesini inhibe etmek için yeniden-aktive edilebilen spesifik hafıza T hücrelerine evrilir. Örneğin,
35 burada tarif edilen CART 19 hücrelerinin güçlü *in vivo* T hücresi genişlemesi

geçirebilmesi ve kanda ve kemik iliğinde uzatılmış bir zaman boyunca yüksek düzeylerde kalmaya devam edebilmesi ve spesifik hafıza T hücreleri oluşturabilmesi beklenmemiştir. Herhangi bir özel teoriye bağlı kalmadan, CAR T hücreleri, destekleyici antijen eksprese eden hedef hücreler ile karşılaşılması ve müteakip eliminasyonu üzerine bir santral hafıza-benzeri hâle farklılaşır.

Herhangi bir özel teoriye bağlı kalmadan, CAR-modifiye edilmiş T hücreleri tarafından medyana getirilmiş anti-tümör immünite yanıtı, bir aktif veya bir pasif immün yanıt olabilir. Buna ek olarak, CAR aracılı immün yanıt, CAR-modifiye edilmiş T hücrelerinin CAR içindeki antijen bağlama kısmına spesifik bir immün yanıt indüklediği bir adoptif immünoterapi yaklaşımının parçası olabilir. örneğin, CART19 hücreleri CD19 eksprese eden hücrelere karşı spesifik olan bir immün yanıt meydana getirir.

Burada açıklanan veriler FMC63 mürin monoklonal antikorundan türetilen anti-CD19 scFv, insan CD8 α menteşe ve transmembran alanı ve insan 4-1BB ve CD3-zeta sinyalleme alanları içeren lentiviral vektörü spesifik olarak açıklarken, buluşun burada başka yerde açıklandığı üzere yapının bileşenlerinin her biri için çok sayıdaki varyasyonu içerdiği yorumu yapılmalıdır.

Tedavi edilebilen kanserler, vaskülarize edilmeyen veya henüz kayda değer şekilde vaskülarize edilmemiş olan tümörleri aynı zamanda vaskülarize edilmiş tümörleri içerir. Kanserler, solid-olmayan tümörleri (örneğin, hematolojik tümörleri, örneğin, lösemileri ve lenfomaları) içerebilir veya solid tümörleri içerebilir. Buluşun CAR'ları ile tedavi edilecek olan kanserlerin tipleri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, karsinomu, blastomu ve sarkomu ve bazı lösemi ve lenfoid malignitelerini, benign ve maligne tümörleri ve maligniteleri, *örn.*, sarkomları, karsinomları ve melanomları, içerir. Erişkin-tip tümörler/kanserler ve pediatrik tümörleri/kanserler de dâhil edilir.

Hematolojik kanserler, kan veya kemik iliği kanserleridir. Hematolojik (veya hematojenöz) kanserlerin örnekleri, akut lösemileri (örneğin, akut lenfositik lösemiye, akut miyelositik lösemiye, akut miyelojenöz lösemiye ve miyeloblastik, promiyelositik, miyelomonositik, monositik ve eritrolösemiye), kronik lösemileri (örneğin, miyelositik (granülositik) lösemiye, kronik miyelojenöz lösemiye ve kronik lenfositik lösemiye) içeren lösemileri, polisitemi verayı, lenfomayı, Hodgkin hastalığını, Hodgkin-dışı lenfomayı (indolent ve yüksek grad formları), multipl miyelomu, Waldenstrom makroglobülinemiyi,

ağır zincir hastalığını, miyelodisplastik sendromu, tüylü hücreli lösemiye ve miyelodisplaziye içerir.

Solid tümörler, genel olarak kistler veya sıvı alanları içermeyen anormal doku kitleleridir. Solid tümörler, benign veya maligne olabilir. Solid tümörlerin farklı tipleri, bunların oluşturan hücreleri tiplerine göre adlandırılır (rneđin, sarkomlar, karsinomlar ve lenfomalar). Solid tümörlerin örneklere, örneğin, sarkomlar ve karsinomlar, fibrosarkomu, miksosarkomu, liposarkomu, kondrosarkomu, osteosarkomu ve diğer sarkomları, sinoviyomu, mezotelyomu, Ewing tümörünü, leiomyosarkomu, rabdomiyosarkomu, kolon karsinomunu, lenfoid maligniteyi, pankreatik kanseri, meme kanserini, akciğer kanserlerini, ovaryan kanseri, prostat kanserini, hepatoselüler karsinomu, skuamöz hücreli karsinomu, bazal hücreli karsinomu, adenokarsinomu, ter bezi karsinomunu, medüller tiroit karsinomunu, papiller tiroit karsinomunu, feokromositomları, sebasz bez karsinomunu, papiller karsinomu, papiller adenokarsinomlarını, medüller karsinomu, bronkojenik karsinomu, renal hücreli karsinomu, hepatomu, safra kanalı karsinomunu, koryokarsinomu, Wilms tümörünü, servikal kanseri, testiküler kanseri, seminomu, idrar kesesi karsinomunu, melanomu ve SSS tümörlerini (rneđin, bir gliyomu (rneđin, beyin-kökü gliyomunu ve karma gliyomları), gliyoblastomu (ayrıca, gliyoblastom multiforme olarak bilinir) astrositomu, SSS lenfomasını, germinomu, medlloblastomu, Schwannomu, kraniyofaryojiyomu, ependimomu, pinealomu, hemanjiyoblastomu, akustik nromu, oligodendrogliyomu, menanjiyomu, nroblastomu, retinoblastomu ve beyin metastazlarını) içerir.

CD19'u hedef alması için tasarlanmış CAR, kanserleri ve bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, pre-B TÜMÜNÜ (pediyatrik endikasyon), erişkin-tip TÜMÜNÜ, mantle hücreli lenfomayı, difüz büyük B-hücreli lenfomayı, allojeneik kemik iliği nakli sonrası son çareyi ve benzerini içeren bozuklukları tedavi etmek için kullanılabilir.

Burada tarif edilen CAR-modifiye edilmiş T hücreleri de, bir memelide *ex vivo* immünizasyon ve/veya *in vivo* terapi için bir aşı tipi görevi görebilir. Tercihen, memeli bir insandır.

Ex vivo immnizasyona ilişkin olarak, ařađıdakilerin en az biri hücreleri bir memeliye uygulamadan önce *in vitro* gerçekleřir: i) hücrelerin genişlemesi, ii) bir CAR şifreleyen

bir nükleik asidi hücrelerin içine uygulama ve/veya iii) hücrelerin dondurarak-saklanması.

5 *Ex vivo* prosedürler, teknikte iyi bilinir ve aşağıda daha bütünüyle tartışılır. Kısaca, hücreler bir memeliden (tercihen, bir insandan) izole edilir ve burada açıklanan bir CAR eksprese eden bir vektörü ile genetik olarak modifiye edilir (yani, *in vitro* aktarılır veya transfekte edilir). CAR-modifiye edilmiş hücre, bir terapötik yarar sağlamak için bir memeli alıcıya uygulanabilir. Memeli alıcı, bir insan olabilir ve CAR-modifiye edilmiş hücre, alıcı açısından otolog olabilir. Alternatif olarak, hücreler, alıcısı açısından 10 allojeneik, sinojeneik veya ksenojeneik olabilir.

Hematopoietik kök ve progenitör hücrelerin *ex vivo* genişlemesi için, 5,199,942 Numaralı US Patentinde tarif edilen prosedür mevcut buluşun hücrelerine uygulanabilir. Diğer uygun yöntemler teknikte bilinir, böylece, mevcut buluş hücrelerin *ex vivo* 15 genişlemesinin herhangi bir özel yöntemi ile sınırlandırılmaz. Kısaca, T hücrelerin *ex vivo* kültürü ve genişlemesi aşağıdakileri içerir: (1) bir insandan periferik kan hasatından veya kemik iliği eksplantlarından CD34+ hematopoietik kök ve progenitör hücrelerini toplama ve (2) bu tarz hücreleri *ex vivo* genişletme. 5,199,942 Numaralı US Patentinde tarif edilen hücresel büyüme faktörlerine ek olarak, diğer faktörler, örneğin, 20 flt3-L, IL-1, IL-3 ve c-kit ligandı, hücrelerin kültürlenmesi ve genişlemesi için kullanılabilir.

Ex vivo immünizasyon açısından bir hücre-temelli aşının kullanılmasına ek olarak, mevcut açıklama ayrıca, bir hastada bir antijene karşı yönlendirilmiş bir immün yanıt 25 meydana getirmek amacıyla *in vivo* immünizasyon için bileşimler ve yöntemler de sağlar.

Genel olarak, burada tarif edildiği şekilde aktive edilmiş veya genişletilmiş hücrelerden immün-yetmezliği olan bireylerde ortaya çıkan hastaların tedavisinde ve önlenmesinde 30 yararlanılabilir. Özel olarak, yukarıda tarif edilen CAR-modifiye edilmiş T hücreleri CCL'nin tedavisinde kullanılır. Belirli uygulamalarda, burada tarif edilen hücreler, CCL geliştirme riski olan hastaların tedavisinde kullanılır. Böylelikle, mevcut açıklama CCL'nin buna ihtiyacı olan bir süjeye buluşun CAR-modifiye edilmiş T hücrelerinin terapötik olarak etkili bir miktarını uygulamayı içeren tedavisini ve önlenmesini sağlar.

Burada tarif edilen CAR-modifiye edilmiş T hücreleri, tek başına veya diluentler ile ve/veya diğer bileşenler, örneğin, IL-2 veya başka sitokinler veya hücre popülasyonları ile kombinasyon hâlindeki bir farmasötik bileşim olarak uygulanabilir. Özet olarak, burada tarif edilen farmasötik bileşimler bir veya birden fazla farmasötik olarak veya

5 fizyolojik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar, diluentler veya eksipiyanlar ile kombinasyon hâlinde, burada tarif edildiği üzere bir hedef hücre popülasyonunu içerebilir. Bu tarz bileşimler tamponları, örneğin, nötral tamponlu salini, fosfat tamponlu salini ve benzerlerini; karbonhidratları, örneğin, glukozu, mannozu, sükrozu veya dekstanları, mannitolü; proteinleri; polipeptitleri veya amino asitleri örneğin, glisini; antioksidanları;

10 şelatlama ajanlarını, örneğin, EDTA veya glutatyonu; adjuvanları (*örn.*, alüminyum hidroksiti) ve koruyucuları içerebilir. Burada tarif edilen bileşimler tercihen, intravenöz uygulama için formüle edilir.

Burada tarif edilen farmasötik bileşimler, tedavi edilecek (veya önlenecek) hastalığa

15 uygun bir şekilde uygulanabilir. Uygulamanın miktarı ve sıklığı, uygun dozajların klinik çalışmalar ile belirlenebilmesine rağmen, hastanın rahatsızlığı ve hastanın hastalığının tipi ve şiddeti gibi faktörler tarafından belirlenebilir.

"Bir immünolojik olarak etkili miktar", "bir anti-tümör etkili miktar", "bir tümör-inhibe etme

20 etkili miktar" veya "terapötik miktar" gösterildiğinde, mevcut buluşun bileşimlerinin uygulanacak olan tam miktarı, hastanın (süjenin) yaşındaki, ağırlığındaki, tümör boyutundaki, enfeksiyonun veya metastazın kapsamındaki ve rahatsızlığındaki münferit farklılıkları düşünerek bir hekim tarafından belirlenebilir. Genel olarak, burada tarif edilen T hücrelerini içeren bir farmasötik bileşimin, bu aralıkların içindeki tüm tam sayı

25 değerleri içeren, 10^4 ila 10^9 hücre/kg vücut ağırlığı, tercihen 10^5 ila 10^6 hücre/kg vücut ağırlığı olan bir dozajda uygulanabileceği ifade edilebilir. T hücresi bileşimleri ayrıca, bu dozajlarda birden fazla kez de uygulanabilir. Hücreler immünoterapide yaygın bir şekilde bilinen infüzyon teknikleri kullanılarak uygulanabilir (bakınız, *örn.*, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). Özel bir hasta için optimal dozaj ve tedavi

30 rejimi tıp tekniğinde uzmanlığı olan biri tarafından hastayı hastalığın bulguları için görüntüleme ve tedaviyi bu doğrultuda ayarlama ile, kolaylık belirlenebilir.

Aktive edilmiş T hücrelerini bir süjeye uygulamak ve akabinde müteakiben kanı geri çekmek (veya gerçekleştirilen bir afereze sahip olmak), buradan T hücrelerini mevcut

35 buluşa göre aktive etmek ve hastayı bu aktive edilmiş ve genişletilmiş T hücreleri ile

yeniden-infüze etmek arzu edilebilir. Bu proses her bir kaç haftada bir bir kaç kere yürütülebilir. T hücreleri, örneğin, 10 cc ila 400 cc'lik kan alımlarından aktive edilebilir. T hücreleri, 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc veya 100 cc'lik kan alımlarından aktive edilir. Teori tarafından sınırlandırılmadan, bu çoklu kan alımı/çoklu
5 yeniden-infüzyon protokolü kullanılarak T hücrelerinin bazı popülasyonlarını seçme görevi görülebilir.

Süje bileşimlerinin uygulanması, aerosol inhalasyonu, enjeksiyonu, ağızdan almayı, transfüzyonu, implantasyonu veya nakli içeren herhangi bir geleneksel şekilde
10 yapılabilir. Burada tarif edilen bileşimler, bir hastaya subkütan, intradermal, intratümöral, intranodal, intramedüller, intramüsküler olarak, intravenöz (*i.v.*) enjeksiyon ile veya intraperitoneal olarak, uygulanabilir. Örneğin, burada tarif edilen T hücresi bileşimleri bir hastaya intradermal veya subkütan enjeksiyon ile uygulanır. Bir başka örnekte, burada tarif edilen T hücresi bileşimleri tercihen *i.v.* enjeksiyon ile uygulanır. T
15 hücrelerinin bileşimleri doğrudan bir tümör, lenf nodu veya enfeksiyon yeri içine enjekte edilebilir.

Belirli durumlarda, burada tarif edilen yöntemler ve teknikte bilinen, T hücrelerinin terapötik düzeylere genişletildiği, başka yöntemler kullanılarak aktive edilmiş ve
20 genişletilmiş hücreler, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, ajanlar ile tedaviyi, örneğin, MS hastaları için anti-viral terapiyi, sidofovir ve interlökin-2, Sitarabin (aynı zamanda, ARA-C olarak bilinir) veya natalizumab tedavisini veya psöriyazis hastaları için efalizumab tedavisini veya PML hastaları için diğer tedavileri içeren çok sayıda ilgili tedavi yöntemleri ile bağlantılı olarak (örn., öncesinde, sırasında veya sonrasında) bir
25 hastaya uygulanır. Burada ayrıca, kemoterapi, radyasyon, immünosüpresif ajanlar, örneğin, siklosporin, azatiyoprin, metotreksat, mikofenolat ve FK506, antikörleri, veya diğer immüno-ablatif ajanlar, örneğin, CAM PATH, anti-CD3 antikörleri veya diğer antikör terapileri, sitoksin, fludarabin, siklosporin, FK506, rapamisin, mikofenolik asit, steroidler, FR901228, sitokinler ve irradyasyon, ile kombinasyon hâlinde kullanılabilen
30 T hücreleri de açıklanır. Bu ilaçlar, kalsiyum-bağımlı fosfataz kalsinörünü (siklosporini ve FK506'yı) inhibe eder ve büyüme faktörü indüklü sinyalleme için önemli olan p70S6 kinazını (rapamisin) inhibe eder (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). Burada ayrıca, kemik iliği nakli, kemoterapi ajanları, örneğin, fludarabin, dış-ışın radyasyon
35 terapisi (XRT), siklofosamid veya antikörler, örneğin, OKT3 veya CAMPATH kullanılan

T hücresi ablatif terapisi ile bağlantılı olarak (örn., öncesinde, sırasında veya sonrasında) bir hastaya uygulanan mevcut buluşun hücre bileşimleri de açıklanır. Burada ayrıca, B-hücresi ablatif terapisini, örneğin, CD20, *örn.*, Rituksan, ile reaksiyona giren ajanları takiben uygulanan mevcut buluşun hücre bileşimleri de tarif edilir.

5 Örneğin, süjeler yüksek doz kemoterapi ile standart tedavi, akabinde periferik kan kök hücre nakli geçirebilir. Bazı durumlarda, nakli takiben, süjeler mevcut buluşun genişletilmiş immün hücrelerinin bir infüzyonunu alır veya genişletilmiş hücreler cerrahi öncesinde veya sonrasında uygulanır.

10 Bir hastaya uygulanacak olan yukarıdaki tedavileri dozajı, tedavi edilmekte olan rahatsızlığın kesin doğası ve tedavinin alıcı ile çeşitlilik gösterecektir. İnsan uygulaması için dozajların ölçeklendirilmesi, teknikte-kabul edilen pratiklere göre yapılabilir. CAMPATH için doz, örneğin, genel olarak, bir erişkin hasta için, genellikle 1 ila 30 günlük bir periyot boyunca günlük olarak uygulanan, 1 ila yaklaşık 100 mg aralığında

15 olacaktır. Bazı durumlarda, günde en fazla 40 mg olan daha büyük dozların kullanılabilmesine rağmen (6,120,766 Numaralı US Patentinde tarif edilmiştir), tercih edilen günlük doz günde 1 ila 10 mg'dır.

DENEYSEL ÖRNEKLER

20

Buluş, aşağıdaki deneysel örneklere atfen detaylı olarak ilaveten tarif edilir. Bu örnekler yalnızca açıklama amacıyla sağlanır ve aksi ifade edilmedikçe sınırlayıcı olması amaçlanmaz. Böylelikle, buluşun herhangi bir şekilde aşağıdaki örnekler ile sınırlandırdığı şeklinde anlam çıkarılamamalıdır, daha ziyade, burada sağlanan

25 öğretinin bir sonucu olarak aşikâr hâle gelecek olan herhangi bir veya tüm varyantları kapsadığı şeklinde yorumlanmalıdır.

İlave açıklama olmadan, teknikte normal uzmanlığı olan birinin, önceki açıklamayı ve aşağıdaki açıklayıcı örnekleri kullanarak, mevcut buluşun bileşiklerini yapabileceğine veya bunlardan yararlanabileceğine ve talep edilen yöntemleri tatbik edebileceğine

30 inanılır. Dolayısıyla, aşağıdaki çalışma örnekleri, spesifik olarak mevcut buluşun tercih edilen uygulamalarını işaret eder ve açıklamanın geri kalanını herhangi bir şekilde sınırlandırdığı şeklinde anlam çıkarılmaz.

Örnek 1: Kimerik reseptörleri eksprese eden T hücreleri, ilerlemiş lösemisi olan hastalarda hafıza ve güçlü anti-tümör etkileri oluşturur

5 Kimerik antijen reseptörleri (CAR'lar) eksprese etmesi için mühendislik uygulanmış olan lenfositler önceki klinik çalışmalarda minimal *in vivo* genişleme ve anti-tümör etkiler göstermiştir. Burada sunulan sonuçlar, CD137 içeren CAR T hücrelerinin ilerlemiş kronik lenfositik lösemili (CLL) tedavi edilmiş üç hastanın üçünde infüzyonu takiben güçlü çapraz-olmayan dirençli klinik aktiviteye sahip olduğunu gösterir. Mühendislik uygulanmış T hücreleri *in vivo* binden daha fazla-kat genişlemiştir, kemik 10 iliğine taşınmıştır ve en az 6 ay boyunca yüksek düzeylerde fonksiyonel CAR eksprese etmeye devam etmiştir. Ortalama olarak, her bir infüze edilmiş CAR+ T hücresi en az 1000 CLL hücresinin kökünü kurutmuştur. Bir CD19 spesifik immün yanıt, üç hastanın ikisinde tam remisyon ile beraber, kanda ve kemik iliğinde gösterilmiştir. Hücrelerin bir kısmı hafıza CAR+ T hücreleri olarak kalmaya devam eder; bu, bu MHC-dışı 15 sınırlandırılmış yaklaşımın B hücresi malignitelerinin etkili tedavisi için potansiyelini gösterir.

Bu örneklerde kullanılan malzemeler ve yöntemler şimdi tarif edilir.

20 **Malzemeler ve Yöntemler**

Genel laboratuvar beyanı

25 Araştırma örneği işleme, dondurma ve laboratuvar analizleri, yerleşik SOP ve/veya örnek alma, işleme, dondurma ve analiz için protokoller ile İyi Laboratuvar Uygulamaları prensipleri altında çalışan Pensilvanya Üniversitesi'nde Translational and Correlative Studies Laboratory'de gerçekleştirilmiştir. Analiz performansı ve veri raporlama, MIATA kılavuzları ile uyumludur (Janetzki et al., 2009, Immunity 31:527-528).

30

Protokol Tasarımı

35 Klinik çalışma (NCT01029366), Şekil 1'de diyagram ile gösterildiği şekilde yürütülmüştür. Önceki en az iki tedavi rejimini takiben inatçı hastalığı ile CD19 pozitif hematolojik malignitesi olan ve allojeneik kök hücre nakli için uygun olmayan hastalar,

çalışma için uygundur. Tümörün yeniden-evrenmesini takiben, CART19 üretimi için periferik kan T hücreleri aferez ile toplanmıştır ve süjelere infüzyondan önceki hafta boyunca Şekil 10'da belirtildiği şekilde bir tek kemoterapi kürü verilmiştir. CART19 hücreleri, Şekil 10'da gösterilen dozda 3 günlük bir yarı doz rejimi (%10, %30 ve %60) kullanılarak intravenöz infüzyon ile uygulanmıştır ve mevcut olduğunda, bir ikinci doz gün 10'da uygulanmıştır; yalnızca UPN 02, bir ikinci infüzyon için yeterli hücreye sahiptir. Süjeler en az 6 ay boyunca sık aralıklarla toksisite ve yanıt için değerlendirilmiştir. Protokol, ABD Gıda ve İlaç Dairesi, Rekombinant DNA Tavsiye Komitesi ve Pensilvanya Üniversitesi Hastane Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

10 İnfüzyonun birinci günü, çalışma Gün 0 olarak ayarlanmıştır.

Süjeler: klinik özet

Klinik özetler, Şekil 10'da genel hatlarıyla özetlenir ve detaylı öyküler burada başka yerde sağlanır. Hasta UPN 01'e ilk olarak 55 yaşında evre II B hücresi CLL tanısı koyulmuştur. Hasta asemptomatiktir ve progresif lenfositoz, trombositopeni, adenopati ve splenomegali için terapi gerektirene kadar yaklaşık 1 - 1/2 yıl boyunca gözlenmiştir. Zaman süreci boyunca, hasta ön terapi basamaklarını almıştır. En yakın tarihli terapi, minimal bir yanıt ile CART19 hücre infüzyonundan 2 ay önce 2 siklus, pentostatin, siklofosfamid ve rituksimabdır. Akabinde, hücre CART-19 hücre infüzyonundan önce lenfo-tüketici kemoterapi olarak bir siklus bendamustin almıştır.

15
20

Hasta UPN 02'ye ilk olarak, hasta yorgunluk ve lökositoz ile sunulduğunda, 68 yaşında CLL tanısı koyulmuştur. Hasta, terapi gerektiren progresif lökositoz (195.000/ μ l), anemi ve trombositopeni geliştirdiğinde, 4 yıl boyunca görece kararlıdır. Karyotipik analiz, CLL hücrelerinin kromozom 17p'nin silinmesine sahip olduklarını göstermiştir. Progresif hastalıktan dolayı, hasta bir parsiyel yanıt ile alemtuzumab ile tedavi edilmiştir, ancak bir buçuk yıl içinde, hasta progresif hastalığa sahiptir. Hasta 18 ay boyunca bir parsiyel yanıt ve 1 yıllık bir progresyonsuz aralık ile alemtuzumab ile tedavi edilmiştir. Akabinde, hasta anlamlı bir yanıt olmadan rituksimab ile bendamustinin 2 siklusunu almıştır (Şekil 5A). Hasta, CART-19 hücre infüzyonundan önce lenfo-tüketici kemoterapi olarak tek ajan bendamustin almıştır.

25
30

Hasta UPN 03 50 yaşında asemptomatik evre I CLL ile sunulmuştur ve gözlem ile yıllarca takip edilmiştir. Hasta terapi gerektiren progresif lökositoz (beyaz kan hücresi

35

sayısı 92.000/ μ l) ve progresif adenopatiye sahiptir. Hasta fludarabin ile rituksimabin 2 siklusunu almıştır, bu kan sayımlarında normalizasyon ve adenopatide tam olmayan rezolüsyonu yoluyla anlamlı iyileşme ile sonuçlanmıştır. Hasta yaklaşık olarak 3 yıllık bir progresyonsuz aralığa sahiptir. Karyotipik testler hücrelerin, 200 hücrenin 170'inde bir *TP53* silinmesi gösteren FISH ile kromozom 17p'nin silinmesini içerdiğini göstermiştir. Sonraki yıllar boyunca, hasta progresif lökositöz ve adenopati için 3 farklı terapi basamağına (Şekil 10) ihtiyaç duymuştur, en son CART19 hücre infüzyonundan 6 ay önce bir parsiyel yanıt ile alemtuzumab almıştır. Hasta, CART-19 hücre infüzyonundan önce lenfo-tüketici kemoterapi olarak pentostatin ve siklofosfamid almıştır.

Vektör Üretimi

CD19-BB-z transgeni (GeMCRIS 0607-793) tasarlanmıştır ve tarif edildiği şekilde yapılmıştır (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17:1453-1464). Lentiviral vektör, tarif edildiği şekilde Lentigen Corporation'da bir üç-plazmitli üretim yaklaşımı kullanılarak güncel iyi üretim uygulamalarına göre üretilmiştir (Zufferey et al., 1997, Nature biotechnol 15:871-875).

CART17 hücre ürününün preparasyonu

Anti-CD3 ve anti-CD28 monoklonal antikoları ile kaplı paramanyetik polistiren bilyeler kullanarak T hücresi preparasyonunun yöntemleri tarif edilmiştir (Laport et al., 2003, Blood 102: 2004-2013). Lentiviral transdüksiyon tarif edildiği şekilde yapılmıştır (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci U S A 103:17372-17377).

Tümör yükü hesaplaması için yöntemler

Baseline'daki CLL yükü, Şekil 10'da gösterildiği şekilde hesaplanmıştır. CLL hücrelerinin sayısı, aşağıda tarif edildiği şekilde kemik iliğinde, kanda ve sekonder lenfoid dokularda hesaplanmıştır.

Kemik iliği: Sağlıklı erişkinlerde, kemik iliği toplam vücut ağırlığının yaklaşık olarak %5'ini temsil eder (Woodard et al., 1960, Phys Med Biol, 5:57-59; Bigler et al., 1976, Health Phys 31:213-218). İliyak kanat örneklerindeki kemik iliği 5 yaşında toplam

kemiğin %20'sinden 35 yaşında yaklaşık %50'sine yükselen, 65 yaşına kadar stabil kalan ve sonra 75 yaşında yaklaşık %67 inaktif iliğe yükselen, yaş ile inaktif (yağlı) iliğin artan bir yüzdesine sahiptir (Hartsock et al., 1965, Am J Clin Path 43:326-331). 35 yaşındaki erkekler için aktif (kırmızı) ve inaktif (yağlı) iliğin toplam iskelet ağırlığı için uluslararası referans değeri güncel olarak, sırasıyla, 1170 g'a ve 2480 g'a ayarlıdır (Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: The Skeleton in Annals of the ICRP, Vol. 25 (ed. Smith, H.) 58-68 (A report of a Task Group of Committee 2 of the International Commission on Radiological Protection, 1995)). 35 ila 65 yaş aralığındaki erişkin erkekler, aktif (kırmızı) ilik olarak %1,6'dan ve inaktif (yağlı) ilik olarak %3,4'ten oluşan, toplam vücut ağırlığının %5,0'ını temsil eden iliğe sahiptir (Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: The Skeleton in Annals of the TCRP, Vol. 25 (ed. Smith, H.) 58-68 (A report of a Task Group of Committee 2 of the International Commission on Radiological Protection, Oxford, 1995)). Kemik iliği biyopsisi ve aspirat numunelerine göre, baseline'da üç hasta için CLL hücrelerinin ağırlığı, Tablo 1'de gösterildiği şekilde hesaplanmıştır. Akabinde, toplam CLL ilik kütlesinin bu tahminleri, $1 \text{ Kg} = 10^{12}$ hücre kullanılarak ilik içindeki toplam CLL hücre sayısına dönüştürülmüştür ve elde edilen sayılar Şekil 10'da gösterilir. Bu hesaplamalar, CLL'nin kemik iliği içinde tekdüze bir dağılıma sahip olduğu varsayımına dayanır. Hasta UPN 01 için, hesaplamalar, bendamustin kemoterapisinden önce alınan bir ilik biyopsisi için ve bendamustinden sonra ve CART19 infüzyonundan önce alınan bir aspirat için gösterilir. Sayılar, gün -1 aspiratının teknik sınırlandırmalarından dolayı gün -14 biyopsi numunesine kıyasla gün -1 aspiratı için daha az kesindir. Hasta UPN 02 iliğin CLL ile tam replasmanını gösteren bir tek tedavi-öncesi biyopsi numunesine sahiptir. Bu hasta CART19 sonrası gün 30'da değişmemiş bir numuneye sahiptir. Hasta UPN 03 için ilik yükü, bir kemoterapi-sonrası ve CART19 öncesi biyopsisine göre hesaplanmıştır.

Tablo 1: İlik Kütlesi

	Aktif İliğin Ağırlığı (kg)	İnaktif İliğin Ağırlığı (kg)	Toplam İlik (kg)
Normal erkekler (ICRP referans standardı)	1.17	2.48	3.65
UPN 01 gün -14 (%95 hücresele)	3.47	0.18	3.65
UPN 02 gün -47 (%95 hücresele)	3.47	0.18	3.65
UPN 03 gün -1 (%60 hücresele)	2.19	1.46	3.65
CLL'nin Ağırlığı (kg)			
UPN 01 gün -14 (%70 CLL)	2.43		
UPN 01 gün -1 (pıhtı ile %50 CLL)	1.73		
UPN 02 gün -47 (>%95 CLL)	3.29		
UPN 03 gün -1 (%40 CLL)	0.88		

- Kan:* Yalnızca hasta UPN 02, kanda CART19 infüzyonu öncesi kayda değer CLL tümör yüküne sahiptir. Akış sitometrisi, hücrelerin bir mat yüzey kappa-sınırlandırılmış CD5+ CD10-CD19+ CD20(mat)+ CD23(değişken)+ IgM-B hücre popülasyonu ile bir klonal popülasyon olarak tipik bir fenotipe sahip olduğunu göstermiştir. CLL hücrelerinin yaklaşık olarak %35'i, CD38'i birlikte-eksprese etmiştir. CLL yükü, 3 siklus bendamustin kemoterapisi ile berrak değildir ve CART19 infüzyonları sırasında mevcuttur. CART 19 infüzyonları sırasında, kandaki CLL sayısı, 55.000 hücre/ μ L'dir. 5,0 L'lik bir kan hacmi varsayarak, hasta UPN 02, gün 0'da kanında $2,75 \times 10^{11}$ CLL hücresine sahiptir. Hastalar UPN 01'de ve 03'te, normal genel WBC göz önünde bulundurulduğunda, bu hastalarda, toplam vücut yüküne biraz az bir değer biçilmesine neden olacak olan, dolaşımdaki hastalık yükü hesaplanmamıştır.
- 15 *Sekonder lenfoid dokular:* Lenfadenopati ve splenomegali hacmi FDA-onaylı yazılım kullanılarak eksensel BT üzerinde kantifiye edilmiştir. Hacimler, yalnızca, göğüs, abdomen ve pelvis içindir. T1 vertebral vücuttan ortak femoral arterin bifurkasyon düzeyine kadarki kütleler tüm hastalarda ölçülmüştür ve bazısında, inguinal alandaki nodlar da dâhil edilmiştir. Baştaki/boyundaki ve kol ve bacaklardaki nodlar, analize dâhil edilmemiştir v baseline CLL hedef hücre sayısına dâhil edilmemiştir, bu ayrıca toplam vücut yüküne biraz az bir değer biçilmesine de neden olacaktır. Hastalar UPN 01 ve 03, 6 ayın ötesine sürdürülmüş tam remisyona sahiptir ve böylece formül (baseline hacim - ay 3 hacmi) baseline'a göre tümör yükündeki düşüşü belirlemek için kullanılmıştır; hasta UPN 02, adenopatide stabil hastalığa sahiptir ve böylece baseline

tümör kütlesi, referans splenik hacmi yaş-eşli sağlıklı erkeklerden çıkarma ile hesaplanır (Harris et al., 2010, Eur J Radiol 75:e97-e101). Baseline tümör kütlesi, bir yoğunluk yaklaşımı (1 Kg/L yoğunluk ve 1 Kg = 10^{12} hücre) hücreleri veya bir hacim yaklaşımı (CLL hücreleri, küresel şekli varsayarak, 10 μ M çapında veya 600 fL'dir) kullanılarak CLL hücrelerine dönüştürülmüştür ve her iki değer Şekil 10'da sunulur. Üç hastada sekonder lenfoid dokulardaki tümör hacimleri, mevcut BT taramalarından hesapladığı şekilde aşağıda Tablo 2'de gösterilir.

10 **Tablo 2: Tümör Hacimleri**

Hasta	Çalışma Günü	LN hacmi (mm ³)	Dalak hacmi (mm ³)	Toplam hacim (mm ³)
UPN 01	-37	239655	1619180	1858835
	1 ay	105005	1258575	1363580
	3 ay	65060	1176625	1241685
UPN 02	-24	115990	1166800	1282790
	1 ay	111755	940960	1052715
UPN 03	-10	239160	435825	674985
	1 ay	111525	371200	482725
	3 ay	47245	299860	347105

Hasta UPN 01 için baseline BT taraması, 2 siklus pentostatin/siklofosfamid/rituksimabdan 8 gün sonra gerçekleştirilmiştir ve önceki BT taramasına kıyasla bu kemoterapi rejimine yanıt göstermemiştir. Hasta CART 19'dan önce bir siklus bendamustin almıştır ve böylelikle UPN 01 için Gün -37'den Gün +31'e tümör hacmindeki değişim bendamustinin aynı zamanda CART19'un potansiyel katkısını dışlayamaz. Benzer şekilde, UPN 03 için tümör hacmindeki değişim 1 siklus pentastatin/siklofosfamidin ve CART19'un birleştirilmiş etkisini yansıtır.

Hastalarda *in vivo* E:T oranında etkili hesaplama (tahmin) için yöntem

İnfüze edilmiş CAR T hücrelerinin öldürülmüş tümör hücrelerinin sayısına E:T oranı, CAR T hücre enjeksiyonu sırasında bulunan tümör hücrelerinin sayısı ve enjekte edilmiş CAR T hücrelerinin sayısı kullanılarak hesaplanmıştır (Carpenito et al., 2009, Proc. Natl Acad Sci U S A 106:3360-3365). Mevcut buluş için, yeterli doğruluk ve kesinlik ile *in vivo* bulunan CART19- T hücrelerinin mutlak sayısını belirlemek mümkün olmadığına, Şekil 10'da gösterildiği üzere enjekte edilmiş CAR19+ T hücrelerinin sayısı kullanılmıştır. Kandaki ve ilikteki CART19 genişlemesinin mevcut verileri, Şekil 10 2'de Şekil 6'da gösterildiği üzere güçlüdür. Buna rağmen, maksimal tümör düşüşü sırasında *in vivo* elde edilen CART19 hücrelerinin toplam sayısı konusunda kayda değer belirsizlik oluşturan, CART19'un diğer yerlere, örneğin, sekonder lenfoid dokulara taşınmasını belirlemek mümkün değildir. Tablo 3'ten hesaplanan değerler, etkili E:T oranlarını türetmek için kullanılmıştır.

15

Tablo 3: *In vivo* elde edilen hesaplanmış CART19 E:T oranları

Hasta	Tümör Yüğü (Baseline ve Delta)				İnfüze edilmiş CART19+ hücreleri	In Vivo E:T
	Kemik iliği Baseline	Kan Baseline	Nodlar/Dalak' Baseline	CLL Yüğündeki Toplam Değişim		
UPN 01	1.70E+12	N/A	8.1E+11	2.51E+12	1.13E+09	1:2200
UPN 02	3.20E+12	2.75E+11	1.6E+12	2.74E+11 ²	5.80E+08	1:1000
UPN 03	8.80E+11	N/A	4.4E+11	1.32E+12	1.42E+07	1:93,000
					Aralık	1000 - 93,000

1 = ortalama yoğunluk ve hacim yöntemi

2 = Hasta UPN 02 kemik iliğinde yanıt vermemiştir ve dalakta ve lenf nodlarında BT ile ölçülen tümör kütlelerinde adenopatide (3,1E+11 hücre) bir parsiyel düşüşe sahiptir. Kandaki yanıt için, bakınız Şekil 5A.

Örnek işleme ve dondurma

20

Örnekler ((periferik) kan, ilik), mor kapaklı (K2EDTA) veya kırmızı kapaklı (katkı maddesi yok) boşaylı tüplere (Becton Dickinson) toplanmıştır ve alındıktan sonraki 2 saat içinde TCSL'ye aktarılmıştır. Örnekler, yerleşmiş laboratuvar SOP'a göre alım sonrasındaki 30 dakika içinde işlenmiştir. Periferik kan ve ilik mononükleer hücreleri,

Ficoll-Paque (GE Health care, 17-1440-03) kullanılarak Ficoll yoğunluk gradyan sentrifügasyonu vasıtasıyla saflaştırılmıştır ve %4 insan serum albümini (Gemini Bio-Products, 800-120), %2 Hetastarch (Novaplus, NDC0409-7248-49) ve %10 DMSO (Sigma, D2650) ile takviye edilmiş RPMI (Gibco 11875-135) içinde 5100 Cryo 1°
 5 dondurma kapları kullanılarak dondurulmuştur; -80°C'de 24-72 saat sonra, hücreler uzun-sürelili saklama için sıvı Nitrojene transfer edilmiştir. Aferez örnekleri Pensilvanya Üniversite Hastanesi Kan Bankası yoluyla elde edilmiştir ve Ficoll gradyan saflaştırma ile CVPF içinde işlenmiştir ve yukarıda olduğu şekilde dondurulmuştur. Buz-çözülmesinin hemen sonrasında viabilite, değerlendirildiğinde %85'ten büyüktür.
 10 Serum izolasyonu için, örneklerin oda sıcaklığında 1,5-2 saat koagüle olmasına izin verilmiştir; serum sentrifügasyon ile izole edilmiştir ve tek kullanımlık 100 µl'lik alikotlar -80°C'de dondurulmuştur.

Hücre hatları

15 K562 (CML, CD19-negatif), ATCC'den (CCL-243) elde edilmiştir, K562/CD19, Carmine Carpenito'nun cömert bir hediyesidir ve CD19 molekülünü eksprese etmesi için %100 sıklıkta lentiviral olarak aktarılmış K562'dir. NALM-6, bir CD19-pozitif T-olmayan, B-olmayan ve CD19 antijeni eksprese ettiği doğrulanmış TÜM öncül B hücresi havuzu
 20 (Hurwitz et al., 1979, Int J Cancer 23:174-180), Laurence Cooper'ın cömert bir hediyesidir. Yukarıdaki hücre hatları %10 fetal bovin serumu (Hyclone) ve %1 Pen-Strep (Gibco, 15140-122) ile takviye edilmiş R10 vasatı (RPMI 1640 (Gibco, 11875) içinde idame ettirilmiştir. Bir sağlıklı donörden periferik mononükleer hücreler (ND365) Pensilvanya Üniversitesi'nde İnsan İmmünoloji Merkezi'nden aferez ile elde edilmiştir,
 25 yukarıdaki şekilde işlenmiştir ve dondurulmuştur.

DNA izolasyonu ve Q-PCR analizi

TAM-kan veya ilik örnekleri, mor kapaklı (K3EDTA) boşaylı tüplere (Becton Dickinson)
 30 toplanmıştır. Genomik DNA, QIAamp DNA kan midi kitleri (Qiagen) ve yerleşmiş laboratuvar SOP'u kullanılarak tam-kandan doğrudan izole edilmiştir ve spektrofotometre ile kantifiye edilmiştir ve -80°C'de saklanmıştır. Genomik DNA örnekleri üzerindeki Q-PCR analizi, 123-200 ng genomik DNA/zaman-noktası, ABI Taqman teknolojisi ve entegre edilmiş CD19 CAR transgeni dizisini saptamak için
 35 valide edilmiş bir analiz kullanılarak yığın içinde gerçekleştirilmiştir. Standart eğri

eğimini ve yeni değerleri, bir referans değeri (1000 kopya/plazmit spayk) doğru bir şekilde kantifiye etme yetisini ve sağlıklı donör DNA'sı örneğinde amplifikasyon olmamasını içeren geçme/alma parametresi aralıkları kalifikasyon çalışmalarından ve önceden-belirlenmiş kabul aralıklarından hesaplanmıştır. CD 19 CAR transgeni için primer/problar tarif edildiği şekildedir (Milone et al., 2009, Mol Ther 17:1453-1464).

5 Kopya sayısı/ birim DNA'yı belirlemek için, 100 ng aktarılmamış kontrol genomik DNA'sı içine eklenmiş olan 10^6 -5 kopya lentivirüs plazmidinden oluşan 8-puanlık bir standart eğrisi üretilmiştir. Her bir veri-noktası (örnekler, standart eğri, referans örnekler) bildirilen ortalama değerler ile üç-kopya hâlinde değerlendirilmiştir. Hasta

10 UPN 01 için, bildirilen tüm değerler, %0,46'dan az olan bir CV %'si ile 3/3 kopyada pozitif bir Ct değerinden türetilmiştir. Hasta UPN 02 için, gün +177 örneği istisnası ile (2/3 kopya pozitif, yüksek CV %'si), bildirilen tüm değerler %0,72'den az olan bir CV %'si ile 3/3 kopyada pozitif bir Ct değerinden türetilmiştir. Hasta UPN 03 için, gün +1

15 örneği istisnası ile (2/3 kopya pozitif, %0,8 CV), bildirilen tüm değerler %1,56'dan az olan bir CV %'si ile 3/3 kopyada pozitif bir Ct değerinden türetilmiştir. Analiz için alt kantifikasyon sınırı (LLOQ), 2 kopya-mikrogram DNA'da (10 kopya/200 ng DNA girdisi) standart eğriden belirlenmiştir; LLOQ altındaki (yani, kantifiye edilemeyen ancak bildirilebilen) ortalama değerlerin yaklaşık olduğu düşünülür. Araştırılan DNA'nın kalitesini kontrol etmek için paralel bir amplifikasyon reaksiyonu, 12-20 ng genomik

20 DNA girdisi, CDKN1A geninin (GENEBANK: Z85996) (yolcu primer: GAAAGCTGACTGCCCTATTTG; SEQ ID NO. 25, rehber primer: GAGAGGAAGTGCTGGGAACAAT; SEQ ID NO. 26, prob: VIC- CTC CCC AGT CTC TTT; SEQ ID NO. 27) transkribe-edilmemiş genomik dizi upstream'ına spesifik olan bir primer/prob kombinasyonu ve kontrol genomik DNA'nın seyreltilmesi ile oluşturulan 8-

25 puanlık bir standart eğrisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir; bu amplifikasyon reaksiyonları bir düzeltme faktörü (CF) (saptanan ng/ ng girdi) üretmiştir. Kopya transgeni/mikrogram DNA, formüle göre hesaplanmıştır: CD19 standart eğrişinden hesaplanan kopya/girdi DNA (ng) x CF x 1000 ng. BU analizin doğruluğu, formüle göre Q-PCR ile infüze edilmiş hücre ürününün işaretlenmesini kantifiye etmesi yetisi ile

30 belirlenmiştir: Ortalama işaretleme = saptanan kopyalar/girdi DNA x 6,3 pg DNA/erkek somatik hücresi x CAR-spesifik saptama reaktifleri kullanılan akış sitometrisi ile transgen pozitifliğine kıyasla CF. Bu kör belirlemeler, UPN 01 infüzyon ürünü için %22,68 işaretleme (akış sitometrisi ile %22,6), UPN 02 infüzyon ürünü için %32,33

35 işaretleme (akış sitometrisi ile %23) ve UPN 03 infüzyon ürünü için %4,3 işaretleme (akış sitometrisi ile %4,7 işaretleme) üretmiştir.

Sitokin analizleri

Çözünebilen sitokin faktörlerinin kantifikasyonu, Luminex bilye dizilim teknolojisi ve Life technologies (Invitrogen) firmasından satın alınan kitler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 5 Analizler, 3-katlık bir seyreltme serisi kullanılarak üretilen 8-puanlık bir standart eğrisi ile üretici protokolü uyarınca gerçekleştirilmiştir. Her bir standart puan ve örnek 1:3'lük seyreltmede iki-kopya hâlinde değerlendirilmiştir; iki-kopya hâlindeki ölçümler için hesaplanan CV %'si %15'ten azdır. Veriler, bir Bioplex 200 üzerinde edinilmiştir ve 5-parametrelili lojistik regresyon analizi kullanılarak Bioplex Manaher versiyon 5.0 yazılımı 10 ile analiz edilmiştir. Standart eğri kantifikasyon aralıkları %80-120 (gözlenen/beklenen değer) aralığı ile belirlenmiştir. Münferit analit kantifikasyon aralıkları Şekil lejantlarında bildirilmiştir.

CAR fonksiyonunu saptamak için hücresel analiz

15 Hücreler buzu-çözüldükten ve TCM içinde gece boyu dinlendirildikten sonra, hedef hücrelere yanıtta CD107 degranülasyonunu ölçme ile işlevsellik için değerlendirilmiştir. Degranülasyon analizler, esas olarak tarif edildiği üzere (Betts et al., 2003, J Immunol Methods 281:6578) 48-kuyucukluklu plakalarda CD49d (Becton Dickinson), anti-CD28, 20 monensin (e-Bioscience) ve CD107a-FITC antikoru (eBiosciences) varlığında 500 µl'lik bir nihai hacim içinde 1×10^6 PBMC ve $0,25 \times 10^6$ hedef hücre kullanılarak 37°C'de 2 saat boyunca gerçekleştirilmiştir.

Antikor reaktifleri

25 Aşağıdaki antikorlar bu çalışmalar için kullanılmıştır: MDA-CAR, Alexa647'ye konjugat bir mürin anti CD 19 CAR antikoru, Dr.'lar Bipulendu Jena'nın ve Laurence Cooper'ın (MD Anderson Cancer Center) cömert bir hediyesidir. Multi-parametrik immüno-fenotipleme ve fonksiyonel analizler için: anti-CD3-A700, anti-CD8-PE-Cy7, anti-PD-1- 30 FITC anti-CD25-AF488, anti-CD28-PercP-Cy5.5, anti-CD57-eF450, anti-CD27-APC-eF780, anti-CD17-APC-eF780, anti-CD45RA-eF605NC, CD107a-FITC (tümü, e-Bioscience), anti-CD4-PE-Texas Red ve Live/Dead Aqua (Life Technologies) ve anti-CD14-V500, anti-CD16-V500 (Becton Dickinson). Genel immüno-fenotipleme için: tümü Becton Dickinson firmasından, CD3-PE, CD14-APC, CD14-PE-Cy7, CD16-FITC, 35 CD16PE-Cy7, CD19-PE-Cy7, CD20-PE.

Multi-parametre akış sitometrisi

Hücreler, Ficoll-Paque işlemlerinden sonra taze veya dondurulduğunda, %5 insan AB serumu (GemCall, 100-512), %1 Hapes (Gibco, 15630-080), %1 Pen-Strep (Gibco, 15140-122), %1 Glutamax (Gibco, 35050-061) ve %0,2 N-Asetil Sistein (American Regent, NDC0517-7610-03) ile takviye edilmiş T hücresi vasatı (TCM) (X-vivo 15 (Lonza, 04-418Q) içinde bir 2×10^6 hücre/ml yoğunluğunda gece boyu dinlendirildikten sonra akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir. Multi-parametrik immüno-fenotipleme, metinde tarif edildiği üzere FMO boyları kullanılarak, 4×10^6 toplam hücre/koşul'da gerçekleştirilmiştir. Hücreler, üretici tarafından tavsiye edilen antikor ve reaktif konsantrasyonları kullanılarak buz üzerinde 30 dakika boyunca bir 1×10^6 hücre/100 µl PBS yoğunlukta boyanmıştır, yıkanmıştır, %0,5 paraformaldehit içinde yeniden-süspansiyon edilmiştir ve Mavi (488 nm) Viyolet (405 nm), Yeşil (532) ve Kırmızı (633 nm) lazerler ve yukarıdaki antikor kombinasyonlarının saptanması ve ayrılması için uygun filtre ayarları ile donatılmış bir modifiye edilmiş LSRII (BD Immunocytometry systems) kullanılarak edinilmiştir. Her bir boyama için minimum 100.000 CD3+ hücre edinilmiştir. Fonksiyonel analizler için, hücreler yıkanmıştır, yüzey belirteçleri için boyanmıştır, %0,5 paraformaldehit içinde yeniden-süspansiyon edilmiştir ve yukarıda olduğu şekilde edinilmiştir; her bir boyama koşulu için minimum 50.000 CD3+ olayı toplanmıştır.

Kompensasyon değerleri tekli antikor boyları ve BD kompensasyon bilyeleri (Becton Dickinson) kullanılarak belirlenmiştir ve hesaplanmıştır ve aygıt tarafından otomatik olarak uygulanmıştır. Veriler FlowJo yazılımı (Version 8.8.4, Treestar) kullanılarak analiz edilmiştir. Genel immüno-fenotipleme için, hücreler bir Mavi (488) ve Kırmızı (633 nm) lazer ile donatılmış bir Accuri C6 sitometre kullanılarak edinilmiştir.

Kompensasyon değerleri tekli antikor boyları ve BD kompensasyon bilyeleri (Becton Dickinson) kullanılarak belirlenmiştir ve manuel olarak hesaplanmıştır. Veriler C-Flow yazılımı analiz paketi (versiyon 1.0,264.9, Accuri sitometreleri) kullanılarak analiz edilmiştir.

Hasta geçmiş tıbbi öyküleri ve terapiye yanıt

Klinik tedavi özetleri, Şekil 10'da genel hatlarıyla özetlenir. Hasta UPN 01 ilk olarak, 55 yaşında evre II B hücresi CLL tanısı almıştır. Hasta asemptomatiktir ve progresif lenfositoz, trombositopeni, adenopati ve splenomegali için terapi gerektirene kadar yaklaşık olarak 1-1/2 yıl boyunca gözlenmiştir. 2 siklus fludarabinden sonra, hasta kan

sayımlarının tam normalizasyonunu ve BT taramaları ile bir tam yanıtı sahiptir. Progresyon, asemptomatik lenfositoz, trombositopeni ve artan adenopati ile 5 ay içinde bildirilmiştir. Hasta, yaklaşık olarak 3 yıl boyunca semptomsuz olarak gözlenmiştir ve daha sonra progresif lökositoz, anemi ve trombositopeni için Rituksimab ve fludarabin ile tedavi gerektirmiştir. Hasta, kan sayımlarında parsiyel iyileşme ile fludarabin ile 4 siklus rituksimab ile tedavi edilmiştir. Hasta yine lökositoz (WBC 150.000/ μ l) ve trombositopen (plateletler 30.000/ μ l) ile ortaya çıkarılan terapi gerektiren bir yıl içinde progresyona sahiptir ve kan sayımlarının normalizasyonu ile alemtuzumab ile tedavi edilmiştir. Progresyon 13 ay içinde bildirilmiştir. Hasta akabinde, anlamlı bir yanıt olmadan tek ajan rituksimab almıştır ve bunu minimal yanıt ile 2 siklus boyunca rituksimab, siklofosamid, vinkristin ve prednison (R-CVP) ve sonrasında lenalidomid izlemiştir. Lenalidomid, toksisiteden dolayı kesilmiştir. Hasta, minimal bir yanıt ile 2 siklus pentostatin, siklofosamid ve rituksimab almıştır.

Daha sonra, hasta CART19 hücre infüzyonundan 4 gün önce lenfo-tüketici kemoterapi olarak bendamustin almıştır. Terapiden önce, WBC, 14.200/ μ l'dir, hemoglobin 11,4 gm/dl'dir, platelet sayısı 78.000/ μ l'dir ve ALC, 8000/ μ l'dir. BT taraması, difüz adenopati göstermiştir ve kemik iliği CLL ile (hücrelerin %67'si) kapsamlı bir şekilde infiltre edilmiştir. Hasta, $1,6 \times 10^7$ CART-19 hücre/kg (FACS ile değerlendirildiği üzere $1,13 \times 10^9$ toplam CART19 hücresi). Burada infüzyonel toksisite yoktur. Hasta bendamustinden yaklaşık olarak 10 gün sonra ve CART19 hücre infüzyonlarından 6 gün sonra nötropenik hâle gelmiştir ve birinci CART19 infüzyonundan 10 gün sonra başlayarak, hasta, ateşler, rigörler ve geçici hipotansiyon geliştirmiştir. Aynı zamanda, bir göğüs röntgeni ve BT taraması, antibiyotikler ile tedavi edilen bir sol üst lop pnömonisi göstermiştir. Ateş yaklaşık olarak 2 hafta boyunca devam etmiştir ve nötrofil geri-kazanımı olduğu çözülmüştür. Hasta ilave enfeksiyöz veya konstitüsyonel semptomlara sahip değildir.

Hasta Şekil 5'te gösterildiği üzere bir çabuk ve tam yanıt başarmıştır. İnfüzyondan sonraki 1 ve 6 ay aralığında, kan içinde akış sitometrisi ile dolaşımdaki olan CLL hücreleri saptanmamıştır. CART-19 hücre infüzyonlarından 1, 3 ve 6 ay sonra kemik iliği, morfoloji ve akış sitometrisi testleri ile sürdürülmüş lenfositik infiltrat yokluğu gösterir. İnfüzyondan sonra 1 ve 3 ayda, BT taramaları, anormal adenopatinin tam rezolüsyonunu gösterir. Hasta, inatçı bir lökopeniye (WBC 1000-3900/ μ l) ve

trombositopeniye (plateletler $\sim 100.000/\mu\text{l}$) ve hafif hipogamaglobüline (IgG 525 mg/dL, normal 650-2000 mg/dL) sahiptir, ancak enfeksiyöz komplikasyonlara sahip değildir.

Hasta UPN 02, 77 yaşında CART19 hücreleri ile tedavi edilmiştir. Hasta, ilgili bir koroner arter hastalığı öyküsüne sahiptir ve ilk olarak hasta yorgunluk ve lökositoz ile sunulduğunda 68 yaşında 2000'de CLL tanısı almıştır. Hasta, terapi gerektiren progresif lökositoz ($195.000/\mu\text{l}$), anemi ve trombositopeni geliştirdiğinde 4 yıl boyunca görece stabildir. Bu sıradaki genetik testler, CLL hücrelerinin kromozom 17p'nin silinmesine sahip olduğunu göstermiştir. Progresif hastalıktan dolayı, hasta bir parsiyel yanıt ve kan sayımlarında iyileşme ile 12 haftalık bir alemtuzumab kürü ile tedavi edilmiştir. Bir buçuk yıl içinde, hasta progresif lökositoz, anemiye, trombositopeniye ve splenomegaliye sahiptir. Karyotip analizi şimdi bir kromozom 13q silinmesi ile kromozom 17p silinmesini doğrulamıştır. Hasta lökositoz iyileşmesi ve anemi ve splenomegali stabilizasyonu ile 18 hafta boyunca alemtuzumab ile yeniden-tedavi edilmiştir. hasta, bir yıl içinde progresif lökositoz, anemi ve trombositopeni bulgusuna sahiptir. tedavi, Şekil 5'da gösterildiği üzere anlamlı iyileşme olmadan stabil hastalık ile sonuçlanan, rituksimab ile 2 siklus bendamustin içermiştir.

Hasta, CART-19 hücre infüzyonu öncesinde lenfo-tüketici kemoterapi olarak tek başına bendamustin almıştır. Hasta, 24 saat boyunca $38,889^\circ$ derece kadar yüksek olan geçici ateşler ile komplike 3 yarı infüzyonda $4,3 \times 10^6$ CART 19 hücre/kg ($4,1 \times 10^8$ toplam hücre) almıştır. Birinci infüzyondan sonra gün 11'de, hasta bir $4,1 \times 10^8$ ($4,3 \times 10^6/\text{kg}$) CART19 hücre desteği almıştır ve bu infüzyon 24 saatlik bir hastaneye yatış gerektiren ateşler, rigolar ve hipoksi olmayan nefes darlığı ile komplikedir. Burada, kardiyak iskemi için bulgu yoktur ve semptomlar çözülmüştür. Birinci CART-19 infüzyondan sonra gün 15'te ve destek CART19 hücre infüzyonundan sonra gün 4'te, hasta yüksek ateşler (en fazla 40°C), üşümeler ve rigolar ile hastaneye yatırılmıştır. Kan ve idrar kültürleri ile kapsamlı testler ve CXR bir enfeksiyon kaynağını tanımlayamamıştır. Hasta, nefes darlığından yakınmıştır ancak hipoksiye sahip değildir. Bir ekokardiyogram, şiddetli hipokinezi göstermiştir. Ejeksiyon fraksiyonu %20'dir. Hasta bir gün boyunca 1mg/kilogram prednison ve yaklaşık olarak bir hafta boyunca 0,3 mg/kilogram almıştır. Bu, ateşin ve kardiyak fonksiyon bozukluğunun çabuk çözülmesi ile sonuçlanmıştır.

Yüksek ateşlerin başlaması ile kesişerek, hasta Şekil 5A'da gösterildiği üzere periferik kandan elde edilen lenfositlerde çabuk bir düşüşe sahiptir. hastanın beyaz kan hücresi sayısında normalizasyona sahip olmasına rağmen, hasta dolaşımında inatçı CLL'ye, stabil orta derecede anemi ve trombositopeniye sahiptir. Kemik iliği, dramatik periferik kan sito-düşüşüne rağmen terapiden bir ay sonra CLL'nin devam eden kapsamlı infiltrasyonunun göstermiştir ve BT taramaları bir adenopati ve splenomegali parsiyel düşüşü göstermiştir. CART19 hücre infüzyonlarından beş ay sonra, hasta progresif lenfositoz geliştirmiştir. İnfüzyonlardan dokuz ay sonra, hasta stabil ılımlı anemi ile lenfositoz (16.500/ μ l) ve stabil adenopati ile trombositopeniye sahiptir. Hasta, asemptomatik olarak kalmıştır ve ilave terapi almamıştır.

Hasta UP 03, 50 yaşında asemptomatik evre I CLL tanısı almıştır ve 6 yıl boyunca gözlem ile takip edilmiştir. Daha sonra, hasta terapi gerektiren progresif lökositoz (beyaz kan sayısı 92.000/ μ l) ve progresif adenopatiye sahiptir. Hasta, kan sayımlarının normalizasyonu ve adenopatide tam çözülme olmadan anlamlı iyileşme ile sonuçlanmış, fludarabin ile 2 siklus rituksimab almıştır. Hasta, yaklaşık olarak 3 yıllık bir progresyonsuz aralığa sahiptir, bunu sonraki 6 ay boyunca çabuk bir şekilde, terapi gerektiren progresif lökositoz (WBC 165.000/ μ l) ve progresif adenopati izlemiştir. hasta kan sayımlarının normalizasyonu ve palpabl adenopatinin çözülmesi ile bir siklus fludarabin ve fludarabin ile 3 siklus rituksimab almıştır. Hasta yeniden çabucak gelişen progrese lökositoz ve adenopati geliştirene kadar yaklaşık 20 aylık bir progresyonsuz aralığa sahiptir. Bu sırada, kemik iliği CLL ile kapsamlı bir şekilde infiltre edilmiştir ve karyotipik analiz hücrelerin, 170-200 hücre içinde bir *TP53* silinmesi gösteren FISH ile kromozom 17p silinmesi içerdiğini göstermiştir. Hasta, bendamustin ile bir siklus rituksimab, akabinde (rituksimaba şiddetli bir alerjik yanıtın dolayısı) yalnızca 4 siklus bendamustin almıştır. Hasta kan sayımlarının başlangıç normalizasyonuna sahiptir, ancak terapinin kesilmesinden kısa bir süre sonra progresif lökositoz ve adenopatiye sahiptir.

Otolog T hücreleri, aferez ile toplanmıştır ve Hasta UPN3'ten dondurularak-saklanmıştır. Hasta akabinde mükemmel bir hematolojik yanıt ile 11 hafta boyunca alemtuzumab ile tedavi edilmiştir. Adenopatide tam çözülme olmamasına rağmen, iyileşme vardır. Hasta sonraki 6 ay boyunca aktif ancak stabil hastalığa sahiptir. Daha sonra, hasta CART19 hücre infüzyonundan önce lenfo-tüketici kemoterapi olarak pentostatin ve siklofosfamid almıştır.

Kemoterapiden üç gün sonra ancak hücre infüzyonundan önce, kemik iliği, CLL tarafından yaklaşık olarak %40'luk tutulum ile hiper-hüreseldir (%60). Tablo 3'te ve (Bonyhadi et al., 2005, J Immunol 174:2366-2375)'te gösterildiği üzere CLL hastalarından aferez toplamalardaki içsel üretim sınırlandırmalarından dolayı, hasta 3 gün boyunca toplam $1,46 \times 10^5$ CART19+ hücresi/kg ($1,42 \times 10^7$ toplam CART19+ hücresi) ile infüze edilmiştir. Burada infüzyonel toksisite yoktur. Birinci infüzyondan on dört gün sonra, hasta üşümelere, $38,889^\circ\text{C}$ kadar yüksek ateşlere, rigorlara, bulantıya ve semptomatik olarak tedavi edilen diyareye sahip olmaya başlamıştır. Hasta, respiratuvar veya kardiyak semptomlara sahip değildir. Infüzyondan sonra gün 22 ile, yüksek bir LDH, ürik asit ile kendini gösteren ve renal yetmezlik ile komplike bir tümör lizis sendromu tanısı koyulmuştur. Hasta hastaneye yatırılmıştır ve ürik asidin ve renal fonksiyonun çabuk normalizasyonu ile sıvı resüsitasyonu ve rasburikaz ile tedavi edilmiştir. Bir CXR, kan, idrar ve gaita kültürleri ile detaylı bir klinik değerlendirme yapılmıştır ve tümü negatif veya normaldir.

CART-19 infüzyonlarının 1 ayı içinde, hasta kandan ve kemik iliğinde dolaşımdaki CLL'nin morfoloji, akış sitometrisi, sitogenetik ve FISH analizi ile klirens sahiptir ve BT taramaları anormal adenopatinin çözülmesini göstermiştir. (Şekil 5C). Hastanın remisyonu, başlangıç CART19 hücre infüzyonundan 8 ay sonrasına sürdürülmüştür.

Deneylerin sonuçları şimdi tarif edilir.

Klinik protokol

İleri, kemoterapi-dirençli CLL'si olan üç hasta Şekil 1'de gösterildiği şekilde bir pilot klinik çalışmaya kaydedilmiştir. Tüm hastalar Şekil 10'da gösterildiği üzere çeşitli kemoterapi rejimleri ve biyolojik rejimler ile kapsamlı bir şekilde ön-tedavi edilmiştir. Hastaların üçü, p53 kusurlu CLL'ye, geleneksel terapiye kötü yanıtın ve çabuk progresyonun işareti olan bir silinmeye, sahiptir (Dohner et al., 1995, Blood, 85:1580-1589). Hastaların her biri, kapsamlı ilik infiltrasyonunun (%40 ila 95) ve lenfadenopatiyi içeren, preparatif kemoterapiyi takiben büyük tümör yüklerine sahiptir; hasta UPN 02 de anlamlı periferik lenfositosa sahiptir. CART19 T hücreleri Şekil 1B'de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır ve her bir hasta için hücre üretiminin ve ürün karakterizasyonunu detayları Tablo 4'te gösterilir. Tüm hastalar, CART19 T hücresi infüzyonlarından 1-4

gün önce lenfo-tüketici kemoterapi ile ön-tedavi edilmiştir. Şekil 1A'da gösterildiği üzere bir 4-1BB ko-stimülör sinyalleme alanını bünyesine katan bir bir CAR test etme çalışmasından dolayı, bir yarı doz hücre infüzyon planlaması kullanılmıştır.

5

Tablo 4: Aferez ürünleri ve CART19 ürün salım kriterleri

	Analiz	Spesifikasyon	UPN 01	UPN 02	UPN 03
Aferez Ürünü					
	CD3+ veya CD45+ için akış sitometrisi	N/A	%4,46	%2,29	%2,67
CART19 Ürünü					
	İnfüze Edilmiş Toplam Hücre Sayısı	~2-5 x 10 ⁹	5 x 10 ⁹	1.275 x 10 ⁹ 1.275 x 10 ⁹ [2.55 x 10 ⁹ toplam]	3 x 10 ⁸
	Hücre Viabilitesi	>= %70	%96,2	95,3 (90,5) ¹	90,3
	CD3+ Hücreleri %'si	>= %80	%88,9	98,8	98,9
	Rezidüel Bilye #	<= 100 bilye / 3 x 10 ⁶ Hücre	3,95	1	4
	Endotoksin	<= 3,5 EU/mL	<0,5 EU/mL	<0,5 EU/mL	<0,5 EU/mL
	Mikoplazma	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
	Sterilite (Bactec)	Büyüme Yok	Büyüme Yok	Büyüme Yok	Büyüme Yok
	Fungal Kültür	Büyüme Yok	Büyüme Yok	Büyüme Yok	Büyüme Yok
	BSA ELİZA	<= 1 µg/mL	<0,5 ng/mL	<0,5	<0,5

Analiz	Spesifikasyon	UPN 01	UPN 02	UPN 03
Aferez Ürünü				
			ng/mL	ng/mL
Replikasyon Kompetan Lentivirüs (RCL)	RCL Saptanamaz	Saptanamaz	Sonuçsuz ²	Sonuçsuz ²
Transdüksiyon Etkililik (scFv Ekspresyonu)	>= %20	%22,6	%23	%4,74 ⁴
Vektör DNA Dizisi (CART19 PCR)	0,2 - 3 kopya/hücre	0,15 ³	0,275	0,101

1= Doz #2.

2 = Gün 12'deki analiz değeri LOQ'nun altındadır ve vektör üretilmesinden plazmit DNA'nın sarkıntısı ile tutarlı olarak genişlemeden erkenden düşmektedir. Bir bilgisel değiştirme olarak FDA'ya gönderilmiştir.

3 = FACS ile yüzey boyamaya dayanan ürün salımı.

4 = Dış DSMC ve IRB tarafından salım kriterleri için izin verilmiş tedavi istisnası.

CART19'un *in vivo* genişlemesi ve devamlılığı ve kemik iliğine taşınması

- 5 CD3/CD28 bilyeleri kullanılarak genişletilmiş ve bir 4-1BB sinyalleme alanı eksprese eden CAR+ T hücrelerinin, 4-1BB'den yoksun olan CAR'lar için iyileşme hâlinde olduğuna inanılmıştır. Bir Q-PCR analizi, kan ve kemik iliği içinde CART 19 hücrelerinin kantitatif taşınmasına olanak sağlamak için geliştirilmiştir. Tüm hastalar Şekiller 2A'da ve 2C'de gösterildiği üzere en az 6 ay boyunca kandaki CART19-hücrelerinin genişlemesine ve devamlılığına sahiptir. Göze çarpar biçimde, UPN 01 ve UPN 03, infüzyon sonrası birinci ay sırasında kanda CAR+ T hücrelerinin 1.000 ila 10.000 katlık bir genişlemesine sahiptir. Pik genişleme düzeyleri, hasta UPN 01'de (gün 15) ve hasta

UPN 03'te (gün 23) infüzyon-sonrası klinik semptomların başlangıcı ile kesişmiştir. Dahası, birinci merteye kinetikler ile modellenebilen bir başlangıç düşüşünü takiben, CART19 T hücreleri, infüzyondan sonra gün 90 ila 180'de tüm hastalarda stabilize olmuştur. Anlamlı olarak, CART19 T hücreleri ayrıca, Şekiller 2D ila 2F arasında
5 gösterildiği üzere kanda gözleendiği üzere 5- ila 10-kat daha düşük düzeylerde olsa da, tüm hastalarda kemik iliğine taşınmıştır. Hastalar UPN 01 ve 03, ~35 günlük bir kaybolma T½'si ile, ilikte bir log lineer düşüşe sahiptir.

10 **CART19 infüzyonunu takiben kan ve kemik iliği kompartimanlarında spesifik immün yanıtların indüksiyonu**

Tüm hastalardan serum örnekleri toplanmıştır ve Şekil 3'te gösterildiği üzere potansiyel toksisiteyi değerlendirmek ve CART19 hücre fonksiyonu bulgusunu sağlamak amacıyla bir sitokinler, kemokinler ve diğer çözünebilir faktörler panelini
15 değerlendirerek, sitokin düzeylerini kantitatif olarak belirlemek için seri analiz edilmiştir. Test edilen on analitten, 4 sitokini (IL-6, INF-γ, IL-8 ve IL-10), 5 kemokini (MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, CXCL9, CXCL10) ve IL-1Rα ve IL-2Rα için çözünebilir reseptörleri içeren on biri, baseline'a göre 3-katlık veya daha fazla bir değişime sahiptir. Bunlardan, interferon-γ baseline'a göre en büyük bağıl değişime sahiptir. İlginç bir şekilde, UPN
20 01'de ve UPN 03'te sitokin yükselmesinin pik zamanı, önceden tarif edilen klinik semptomlar ve her bir hastanın kanındaki CART19 hücrelerinin pik değerleri ile geçici olarak korele olmuştur. Hasta UPN 02'de, belki de bu hastaya verilen kortikosteroid tedavisinin bir sonucu olarak, yalnızca ılımlı değişimler bildirilmiştir. 4-1BB sinyalleme alanları olan CAR+ T hücreleri geliştirmek için pre-klinik gerekçelerin birinin CD28
25 sinyalleme alanları ile karşılaştırıldığında IL-2 salgılanmasını tetiklemek için düşük eğilim olmasından dolayı, çözünebilir IL-2'nin yükselmesi hastaların serumunda saptanmamıştır (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17:1453-1464). Önceki çalışmalar CAR+ T hücrelerinin potansiyel olarak regülatör T hücreleri (Lee et al., 2011, Cancer Res 71:2871-2881) veya kayda değer miktarlarda IL-2 salgılayan CAR'lar tarafından
30 ortaya çıkarılan hücreler tarafından veya infüzyon-sonrası ekzojen IL-2 sağlanması ile baskılandığını gösterdiğinden, bu sürdürülmüş klinik aktivite ile ilgili olabilir. Son olarak, UPN 03'ün kemik iliği aspiratlarından elde edilen süpernatantlarda sitokin salgılanmasının güçlü bir indüksiyonu Şekil 3D'de gösterildiği şekilde gözlenmiştir, bu aynı zamanda, tümör lizis sendromunun ve tam remisyonun gelişmesi ile kesişmiştir.

Kanda hafıza CART 19 hücrelerinin bir popülasyonunun uzatılmış ekspresyonu ve yerleşmesi

CAR-aracılı kanser immünoterapisindeki merkezi bir soru, optimize edilmiş hücre
 5 üretiminin bir ko-stimülasyon alanlarını genetik olarak modifiye edilmiş T hücrelerinin
 devamlılığını hızlandırıp hızlandırmadığı ve hastalarda CAR+ hafıza T hücrelerinin
 yerleşmesine izin verip vermediğidir. Önceki çalışmalar, infüzyondan sonra T hücreleri
 üzerinde CAR'ların güçlü genişlemesini, uzatılmış devamlılığını ve/veya
 ekspresyonunu göstermemiştir (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115;
 10 Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24:e20-e22; Till et al., 2008, Blood, 112, 2261-2271;
 Savoldo et al., 2011, J Clin Invest doi:10. 172/JC146110). İnfüzyondan sonraki 169
 günde kemikten ve ilikten alınan örneklerin akış-sitometrik analiz, UPN 03'te CAR19
 eksprese eden hücrelerin varlığını (Şekiller 4A ve 4B) ve Şekil 4A'da gösterildiği üzere
 bir B-hücresi yokluğunu ortaya çıkarmıştır. Göze çarpan bir şekilde, Q-PCR analizi ile,
 15 üç hastanın tümü, Şekil 2'de ve Şekil 6'da gösterildiği üzere 4 ayda ve ötesine kalmaya
 devam eden CAR+ hücrelerine sahiptir. CAR+ hücrelerinin akış sitometrisi ile *in vivo*
 sıklığı, CART19 transgeni için PCR analizinden elde edilen değerler ile hemen hemen
 eşleşmiştir. Önemli olarak, hasta UPN 03'te, Şekil 4A'da gösterildiği üzere CAR 19+
 hücreleri CD16- veya CD14-pozitif alt-kümelerde saptanamadığından, yalnızca CD3+
 20 hücreleri CAR19 eksprese etmiştir. CAR ekspresyonu ayrıca, Şekil 7'de gösterildiği
 üzere infüzyondan sonra gün 71'de hasta UPN 01'in kanında T hücrelerinin %4,2'sinin
 yüzeyinde de saptanmıştır.

Sonra, polikromatik akış sitometrisi, bir anti-CAR idiyotip antikor (MDA-647) ve Şekil
 25 8'de gösterilen bir kapılama stratejisi kullanılarak UPN 03'te CART19 hücrelerinin
 ekspresyonunu, fenotipini ve fonksiyonunu ilaveten karakterize etmek amacıyla detaylı
 çalışmalar gerçekleştirmek için kullanılmıştır. CAR 19 ekspresyonuna göre hem CD8+
 hem de CD4+ hücrelerinde hafıza ve aktivasyon belirteçlerinin ekspresyonunda göze
 çarpan farklılıklar gözlenmiştir. Gün 56'da, CART 19 CD8+ hücreleri, Şekil 4C'de
 30 gösterildiği üzere antijene uzatılmış ve güçlü maruziyet ile tutarlı bir şekilde primer
 olarak bir efektör hafıza fenotipi (CCR7-CD27-CD28-) göstermiştir. Aksine, CAR-
 negatif CD8+ hücreleri, hücrelerin bir alt-kümesinde CCR7 ekspresyonu ve
 CD27+/CD28- ve CD27+/CD28+ fraksiyonlarında kayda değer sayılar ile, efektör ve
 santral hafıza hücrelerinin karışımlarından oluşmuştur. Hem CART19 ve CAR-negatif
 35 hücre popülasyonları kayda değer ölçüde CD57 eksprese ederken, bu molekül

CART19 hücrelerinde tek düze bir şekilde PD-1 ile birlikte-eksprese edilmiştir, bu, bu hücrelerin kapsamlı replikatif öyküsünün olası bir yaklaşımıdır. CAR-negatif hücre popülasyonunun aksine, CART19 CD8+ popülasyonunun bütünü hem CD25 hem de CD127 ekspresyonundan yoksundur. Gün 169 ile, CAR-negatif hücre popülasyonunun fenotipi gün 56 örneğine benzer kalırken, CART19 popülasyonu santral hafıza hücreleri, göze çarpan bir şekilde CCR7 ekspresyonu, yüksek düzeylerde CD27 ve CD28 aynı zamanda PD-1-negatif, CD57-negatif ve CD127-pozitif olan CAR+ hücreleri özellikleri olan bir azınlık popülasyonu içermesi için evrilmiştir.

10 CD4+ kompartımanında, gün 56'da CART 19 hücreleri, Şekil 4B'de gösterildiği üzere tekdüze CCR7 yokluğu ve hem CD57+ hem de - kompartımanları içine dağılmış bir CD27+/CD28+/PD-1+ hücreleri üstünlüğü ve bir CD25 ve CD127 ekspresyon esansiyel yokluğu ile karakterize edilmiştir. Aksine, bu zaman-noktasında CAR-negatif hücreleri CCR7, CD27 ve PD-1 ekspresyonu içinde heterojendir, CD127 eksprese etmiştir ve aynı zamanda kayda değer bir CD25+/CD127- (potansiyel regülatör T hücresi) popülasyonu da içermiştir. Gün 169 ile, CD28 ekspresyonu tüm CAR+CD4+ hücrelerinde tekdüze bir şekilde pozitif kalırken, CART19 CD4+ hücrelerinin bir fraksiyonu CCR7 ekspresyonu, daha yüksek bir CD27-hücresi yüzdesi, bir PD-1-negatif alt-küme görünüşü ve CD127 ekspresyonu edinilmesi ile bir santral hafıza fenotipine doğru evrilmiştir. CAR-negatif hücreleri, CD27 ekspresyonunda bir düşüş, CD25+/CD127- hücrelerinin yüzdesinde bir düşüş, istisnası ile, bunların gün 56 karşılıkları ile mantıklı bir şekilde tutarlı kalmıştır.

CART19 hücreleri, kanda 6 aydan sonra efektör fonksiyonunu muhafaza edebilir

25

Kısa devamlılığa ve yetersiz *in vivo* proliferasyona ek olarak, CAR+ T hücreleri ile önceki çalışmaların bir sınırlaması, infüze edilmiş T hücrelerinin *in vivo* fonksiyonel aktivitesinin çabuk kaybıdır. UPN 01'de ve 03'te yüksek düzeyde CART19 hücresi devamlılığı ve ve CAR19 molekülünün yüzey ekspresyonu, dondurarak-saklanmış periferik kan örneklerinden geri-kazanılan hücrelerde anti-CD 19-spesifik efektör fonksiyonları doğrudan test etme fırsatı sağlamıştır. Hasta UPN 03'ten PBMC, CD 19 ekspresyonu için pozitif veya negatif olan hedef hücreler ile kültürler (Şekil 4d). CART19 T hücrelerinin güçlü CD19-spesifik efektör fonksiyonu, yüzey CD107a ekspresyonu ile değerlendirildiği üzere, CD19-negatif değil ancak CD19-pozitif hedef hücrelere karşı spesifik degranülasyon ile gösterilmiştir. Göze çarpan bir şekilde,

35

CART19 popülasyonunun CD19-pozitif hedeflere maruziyeti standart akış-sitometrik boyamada aynı efektör hücrelerde CAR 19'un yüzey ekspresyonu için Şekil 8'de gösterildiği üzere yüzey bir çabuk CAR-19 içselleştirilmesini indüklemiştir. NALM-6 hattı CCD80 veya CD86 eksprese etmediğinden (Brentjens et al., 2007, Clin Cancer Res 13:5426-5435), hedef hücreler üzerinde ko-stimülatör moleküllerinin varlığı, CART19 hücresi degranülasyonunu tetiklemek için gerekli olmamıştır. Efektör fonksiyon, infüzyondan sonra gün 56'da bulgulanmıştır ve gün 169 zaman-noktasında muhafaza edilmiştir. CAR+ ve CAR-T hücrelerinin güçlü efektör fonksiyonu farmakolojik stimülasyon ile de gösterilebilir.

10

CART19 hücrelerinin klinik aktivitesi

Geçici febril reaksiyonların dışında, herhangi bir hastada infüzyonu takip eden dört gün boyunca gözlenen anlamlı toksisite yoktur. Buna rağmen, tüm hastalar müteakiben, birinci infüzyonu takip eden gün 7 ve 21 arasında anlamlı klinik ve laboratuvar toksisiteleri geliştirmiştir. Bu toksisiteler kısa-sürelidir ve geri-dönüşümlüdür. Şimdiye kadar tedavi edilen üç hastada, standart kriterlere göre CART19 infüzyonundan sonra >6 ayda 2 CR ve 1 PR vardır (Hallek et al., 2008, Blood 111:5446). Her bir hasta için geçmiş tıbbi öykünün ve terapiye yanıtın detayları Şekil 10'da gösterilir.

20

Özet olarak, UPN 01 infüzyondan 10 gün sonra başlayan rigörler ve geçici hipotansiyon ile bir febril sendrom geliştirmiştir. Ateşler, yaklaşık olarak 2 hafta boyunca devam etmiştir ve çözülmüştür; hasta ilave konstitüsyonel semptomlara sahip olmamıştır. Hasta Şekil 5'te gösterildiği üzere bir çabuk ve tam yanıt elde etmiştir. Infüzyondan sonraki 1 ve 6 ay arasında, kanda akış sitometrisi ile dolaşım hâlindeki CLL hücreleri saptanmamıştır. CART19 hücre infüzyonlarından sonra 1, 3 ve 6 ayda kemik iliği Şekil 5B'de gösterildiği üzere morfoloji ve akış sitometrik anali ile sürdürülmüş lenfositik infiltrat yokluğu gösterir. Infüzyondan sonra 1 ve 3 ayda BT taramaları, Şekil 5C'de gösterildiği üzere adenopatinin çözülmesini gösterir. Tam remisyon bu rapor sırasında 10+ ay boyunca sürdürülmüştür.

30

Hasta UPN 02, Şekil 5A'da gösterildiği üzere stabil hastalık ile sonuçlanan rituksimab ile 2 siklus bendamustin ile tedavi edilmiştir. Hasta, CART19 T hücresi infüzyonundan önce lenfo-tüketici kemoterapi olarak bi üçüncü bendamustin dozu almıştır. Hasta, birinci infüzyondan sonra gün 11'de ve ikinci CART19 hücre takviyesi gününde 24

35

- saatlik bir hastaneye yatış gerektiren 40°C'ye kadar ateşler, rigorlar ve dispne geliştirmiştir. Ateşler ve konstitüsyonel semptomlar kalmaya devam etmiştir ve gün 15'te, hasta geçici kardiyak fonksiyon bozukluğuna sahiptir; kortikosteroid terapisinden sonra çözülen tüm semptomlar gün 18'de başlatılmıştır. CART 19 infüzyonunu takiben
- 5 ve yüksek ateşlerin başlangıcı ile kesişerek, hasta Şekil 5A'da gösterildiği üzere periferik kandan p53-kusurlu CLL'nin çabuk klirensine ve parsiyel bir adenopati düşüşüne sahiptir, kemik iliği dramatik periferik kan sito-düşüşüne rağmen terapiden bir ay sonra CLL'nin inatçı kapsamlı infiltrasyonunu göstermiştir. hasta asemptomatik kalır.
- 10 Hasta UPN 03, CART19 hücre infüzyonu öncesinde lenfo-tüketici kemoterapi olarak pentostatin ve siklofosamid almıştır. Kemoterapiden üç gün sonra ancak hücre infüzyonundan önce, kemik iliği, CLL tarafından yaklaşık olarak %50 tutulum hiper-hüreseldir (%60). Hasta, düşük bir dozda CART19 hücresi almıştır (3 güne bölünmüş 1.5×10^5 CAR+ T hücresi/kg). Yine, burada akut infüzyonel toksisiteler yoktur. Buna
- 15 rağmen, birinci infüzyondan 14 gün sonra, hasta rigorlara, ateşlere, bulantıya ve diyareye sahip olmaya başlamıştır. İnfüzyondan sonra gün 22 ile, hastaneye yatış gerektiren tümör lizis sendromu tanısı koyulmuştur. Hasta, konstitüsyonel semptomların çözülmesine sahiptir ve CART19 infüzyonlarının 1 ayı içinde, hasta kandan ve kemik iliğinden dolaşmakta olan CLL'nin morfoloji, akış sitometrisi,
- 20 sitogenetik ve FISH analizi ile klirensine sahiptir. BT taramaları Şekiller 5B'de ve 5C'de gösterildiği üzere anormal adenopati çözülmesi göstermiştir. Tam remisyon başlangıç CART19 hücresi infüzyonundan 8 ay ötesine sürdürülmüştür.

İn vivo CART19 efektörün CLL hedef hücreye oranı hususları

- 25 Bu hesaplamaların enjeksiyon sonrasında T hücrelerinin genişlemesini hesaba katmamasına rağmen, pre-klinik çalışmalar, beşerileştirilmiş farelerde *in vivo* bir 1:42 E:T oranı için, büyük tümörlerin kesip çıkarılabildiğini ve $2,2 \times 10^7$ CAR'ın infüzyonunun 1×10^9 hücreden oluşan tümörlerin kökünü kurutulabildiğini göstermiştir (Carpenito et
- 30 al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-3365). Zamanla CLL tümör yükünün hesabı, tümör düşüşünün hesaplanmasına izin vermiştir ve infüze dilmiş CAR+ T hücrelerinin sayısına göre üç süjude *in vivo* başarılan CART19 E:T oranlarını hesaplamıştır. Tümör yükleri, kemik iliği, kan ve sekonder lenfoid dokular içinde CLL yükünü ölçme ile hesaplanmıştır. Şekil 10'da gösterildiği üzere baseline tümör yükleri,
- 35 her bir hastanın CART19 infüzyonundan önce 10^{12} mertebesinde CLL hücresine (yani,

1 kilogram tümör yükü) sahip olduğunu gösterir. Hasta UPN 03, volümetrik BT tarama analizi yöntemine göre, gün -1'de (yani, kemoterapiden sonra ve CART19 infüzyonu öncesinde) kemik iliğinde $8,8 \times 10^{11}$ CLL hücresi olarak hesaplanmış bir baseline tümör yüküne ve sekonder lenfoid dokularda $3,3-5,5 \times 10^{11}$ CLL hücresi olarak ölçülmüş tümör kütlelerine sahiptir. UPN 03'ün, başlangıç toplam tümör yükü hesabı ($1,3 \times 10^{12}$ CLL hücre) kullanılarak, yalnızca $1,4 \times 10^7$ CART19 hücreleri ile infüze edildiği ve CLL hücrelerinin tedaviden sonra saptanabilir olmadığı göz önüne alındığında, göze çarpan bir 1:93.000 E:T oranı elde edilmiştir. Benzer hesaplamalar ile, 1:2200 ve 1:1000 olan etkili bir *in vivo* E:T oranı, Şekil 3'te gösterildiği üzere UPN 01 ve UPN 02 için hesaplanmıştır. En sonunda, >1.000-katlık *in vivo* CART19 genişlemesi ile birleştirilmiş, CART19 T hücreleri ile bir seri öldürme katkısı büyük olasılıkla, CART19 hücreleri tarafından aracılık edilen güçlü anti-lösemik etkilere katkı sağlar.

Kimerik reseptörler eksprese eden T hücreleri, ileri lösemisi olan hastalarda hafıza ve güçlü antitümör etkileri oluşturur

CAR'ların sınırlı *in vivo* ekspresyonu ve efektör fonksiyonu, birinci nesil CAR'ları test eden çalışmalarda merkezi bir sınırlandırmadır (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115; Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24:e20-e22; Till et al., 2008, Blood, 112, 2261-2271; Park et al., 2007, Mol Ther 15:825833; Pule et al., 2008, Nat Med 14:1264-1270). Bir 4-1BB sinyalleme modülü içeren CAR'ların artırılmış devamlılığını gösteren pre-klinik modellemeye göre (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17:1453-1464; Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-3365), lentiviral vektör teknolojisi ile mühendislik uygulanmış CAR'ların bir ikinci neslini geliştirmek için deneyler tasarlanmıştır. CAR'ların bu ikinci neslinin, kronik HIV enfeksiyon koşulunda güvenli olduğu bulunmuştur (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci U S A 103:17372-17377). Mevcut sonuçlar, bu ikinci nesil CAR, T hücrelerinde eksprese edildiğinde ve santral hafıza T hücrelerinin yamanmasını hızlandırmak için tasarlanan koşullar altında kültürlendiğinde (Rapoport et al., 2005, Nat Med 11:1230-1237; Bondanza et al., 2006, Blood 107:1828-1836), önceki raporlara kıyasla infüzyondan sonra CAR T hücrelerinin iyileştirilmiş genişlemesinin gözlemlendiğini gösterir. CART 19 hücreleri, CD-19-spesifik hücresel hafızayı oluşturmuştur ve önceden başarılmamış *in vivo* E:T oranlarında tümör hücrelerini öldürmüştür.

CART19, bir 4-1BB sinyalleme alanını katmak için ilk CAR çalışmasıdır ve ilk lentiviral vektör teknolojisi kullanımınıdır. Mevcut sonuçlar, CD19 özgüllüğü gösteren "tümör infiltrate eden lenfositlerin" *de facto* oluşturulması ile, CAR'ların tümör yerine etkili taşınmasını gösterir. Göze çarpan *in vivo* genişleme, hastalardan doğrudan geri-kazanılan

5 CAR'ların *in vivo* efektör fonksiyonu aylar boyunca muhafaza edebileceğinin ilk kez gösterilmesine izin vermiştir. Önceki bir çalışma, bir birinci nesil CAR'ın virüs spesifik T hücrelerinin içine uygulanmasının primer T hücreleri için tercih edilebilir olduğunu öne sürmüştür (Pule et al., 2008, Nat Med 14:1264-1270), buna rağmen, optimal olarak kostimüle edilmiş primer T hücreleri içine uygulanmış ikinci nesil CAR'lar ile sonuçlar bu

10 kavramda şüpheye neden olur. Herhangi bir özel teori tarafından sınırlandırılmadan, klinik etkilerin hastaların ikisinde potansiyel olarak tehlike olan yüksek düzeylerde sitokinin geciktirilmiş salımı ile birlikte üç hastanın tümünde kilogram boyutlarındaki tümör yüklerinin lizisi ile çok ve benzersiz olduğu bir uyarıcı notu ortaya çıkarılır. Klasik sitokin fırtınası etkileri gözlenmemiştir. Buna rağmen, mevcut çalışma, üç günlük bir

15 periyot boyunca CART19'un kasıtlı infüzyonunu ile bu olasılığı hafifletmek için tasarlanmıştır.

Çok düşük dozlardaki CAR'ların güçlü klinik yanıtlar meydana getirebildiği bulunmuştur. Bu, CART19 vektör tasarımının güvenliğini gösteren bir pilot çalışmadır. Önceki

20 çalışmalarda test edilenlerin bir kaç mertebe altındaki büyüklerdeki CART19 hücreleri dozlarının klinik yarara sahip olabileceği gözlemi, aha geniş bir ölçekte CAR terapisinin ilave uygulaması için ve CD19 dışındaki hedeflere karşı yönlendirilmiş CAR'ları test eden çalışmaların tasarımı için önemli olabilir.

25 Mevcut çalışmalar ilaveten, CART19'un hem santral hem de efektör T hücrelerin eksprese edildiğini ve bunun büyük olasılıkla önceki raporlar ile karşılaştırıldığında bunların uzun süreli sağ kalımına katkı sağladığını gösterir. Herhangi bir özel teori tarafından sınırlandırılmadan, CAR T hücreleri, destekleyici antijeni eksprese eden hedef hücreler (örn., CLL tümör hücreleri veya normal B hücreleri) ile karşılaştırılması ve

30 müteakip eliminasyonu üzerine bir santral hafıza-benzeri hâle *in vivo* farklılaşabilir. Gerçekte, 4-1BB sinyallemesinin, TCR sinyallemesi bağlamında hafıza gelişimini desteklediği bildirilmiştir (Sabbagh et al., 2007, Trends Immunol 28:333-339).

CART19'un genişletilmiş proliferasyonu ve sağ kalımı, daha önceden bildirilmemiş

35 olan, CAR T hücrelerinin farmakokinetiklerinin yönlerini ortaya çıkarmıştır. Serum ve ilik

içinde sitokin salımının kinetiklerinin pik CART19 düzeyleri ile korele olduğu gözlenmiştir, böylece CD19 eksprese eden hücrel hedefler sınırlayıcı hâle geldiğinde düşmenin başlatılması olasıdır. CART19'un uzatılmış sağ kalım mekanizması, 4-1BB alanının yukarıda-bahsedilen katılması ile veya doğal TCR ve/veya CAR yoluyla sinyalleme ile ilgili olabilir. İlgili uyandıran bir olasılık, uzatılmış sağ kalımın kemik iliği numuneleri içinde tanımlanmış olan CART19 popülasyonu ile ilgili olmasıdır, bu CD19 CAR'ların kemik iliğinde B hücresi progenitörleri ile karşılaşma ile idame ettirebildiği hipotezini ortaya çıkarır. Bununla ilgili olarak, soru CART 19 hücrelerinin *in vivo* başlangıç genişlemesine neyin yön verdiğidir? Nadir istisnalar ile (Savoldo et al., 2011, J Clin Invest doi:10.1172/JCI46110; Pule et al., 2008, Nat Med 14:1264-1270), mevcut çalışma, dâhil edilmemiş IL-2 infüzyonlarına sahip olmak için tek çalışmadır, böylece CART19 hücreleri büyük olasılıkla homeostatik sitokine veya daha büyük olasılıkla lösemik hedefler ve/veya normal B hücreleri üzerinde eksprese edilen CD19'a yanıtta genişlemiştir. Son bahsedilen durumda, "kendi aşılama/destekleme" ve böylece uzun süreli tümör immüno-takip vasıtasıyla CAR hafızası için bir mekanizma sağlayarak, CART19'un kendini yenilemesinin normal hücreler üzerinde gerçekleşmesi olası olduğundan, bu normal APC'ler üzerindeki hedeflere, örneğin, CD19'a ve CD20'ye, karşı yönlendirilmiş CAR'lar için çekici bir özellik olabilir. CART19 homeostazının mekanizmaları, devamlılığın hücre içsel ve dışsal mekanizmalarını açığa kavuşturmak için ilave çalışma gerekebilir. Bu sonuçlardan önce, çoğu araştırmacı, CAR terapisini immünoterapinin geçici bir formu olarak görmüştür; buna rağmen, optimize edilmiş sinyalleme alanları ile CAR'lar remisyon indüksiyonunda ve konsolidasyonunda aynı zamanda uzun süreli immüno-takip için bir role sahip olabilir.

Güçlü anti-lösemik etkiler, p53 kusurlu lösemisi olan iki hastayı içeren, üç hastanın tümünde gözlenmiştir. CAR'lar ile önceki çalışmalar, lenfo-tüketici kemoterapiden anti-tümör etkileri ayırmada zorluğa sahip olabilir. Buna rağmen, mevcut çalışmada *in vivo* CAR genişlemesi ile kesişen ve büyük olasılıkla buna bağlı olan fludarabin-refrakter hastalarda tümör lizisinin kinetikleri ile birleştirilmiş geciktirilmiş sitokin salımı, CART19'un güçlü anti-tümör etkilere aracılık ettiğini gösterir. Mevcut sonuçlar, CAR'ların etkilerini arttırmada kemoterapi için bir rolü dışlamaz.

Vektör, transgen ve hücre üretim prosedürlerinin diğer merkezlerde devam eden çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile kapsamlı bir karşılaştırması, CAR T hücrelerinin *in vivo* sürdürülmüş fonksiyonunu elde etmek için gerekli olan önemli özelliklerin tam

olarak anlaşılmasını sağlamak için gerekli olabilir. Antikor terapilerinden farklı olarak, CAR-modifiye edilmiş T hücreleri *in vivo* çoğalma potansiyeline sahiptir ve uzun-sürelili devamlılık, sürdürülmüş tümör kontrolüne yol açabilir. Satışa hazır bir terapinin yararlılığı, B hücresi maligniteleri olan hastaların sonucunu iyileştirme potansiyeline sahip olan çapraz-olmayan dirençli katil T hücrelerinden oluşmuştur. Örnek olarak, ajanlar, örneğin, rituksimab ve bevicizumab, ile bir antikor terapisi sınırlandırması, terapinin tekrarlı antikor infüzyonları gerektirmesidir, bu zahmetli ve maliyetlidir. Uzatılmış antikor terapisinin (bu durumda, şimdiye kadar tedavi edilmiş 3 hastanın 3'ünde en az 6 ay boyunca) CART19 hücrelerinin bir tek infüzyonunu takiben T hücreleri üzerinde eksprese edilen anti-CD19 scFv ile aktarımı, kolaylığı ve maliyet tasarruflarını içeren, çok sayıda pratik avantaja sahiptir.

Örnek 2: Kronik Lenfoid Lösemide Kimerik Antijen Reseptörü-Modifiye Edilmiş T hücreleri

B-hücresi antijeni CD19 için özgülüğü olan bir kimerik antijen reseptörünü eksprese eden, CD137 (T hücrelerinde bir ko-stimülatör reseptörü [4-1BB]) ve CD3-zeta (T-hücresi antijen reseptörünün bir sinyal-iletim bileşeni) sinyalleme alanları ile kuple edilmiş, bir lentiviral vektör tasarlanmıştır. Refrakter kronik lenfositik lösemisi (CLL) olan bir hastaya yeniden-infüze edilmiş otolog kimerik antijen reseptörü-modifiye edilmiş T hücrelerinin düşük bir dozunun (yaklaşık olarak $1,5 \times 10^5$ hücre/vücut ağırlığının kilogramı) *in vivo* başlangıç yamanma düzeyinin 1000 katından daha yüksek olan bir düzeye genişlediği gözlenmiştir. Hastanın tümör lizis sendromunun geciktirilmiş gelişmesini gösterdiği ve tam remisyonu hâlinde olduğu da gözlenmiştir.

Tümör lizis sendromunun yanı sıra, kimerik antijen reseptörü T hücreleri ile ilgili yalnızca başka grad 3/4 toksik etki lenfopenidir. Mühendislik uygulanmış hücreler, kanda ve kemik iliğinde en az 6 ay boyunca yüksek düzeylerde kalmaya devam etmiştir ve kimerik antijen reseptörünü eksprese etmeye devam etmiştir. Spesifik bir immün yanıt, CD19 eksprese eden normal B hücrelerinin ve lösemi hücrelerinin kaybı ile birlikte, kemik iliğinde saptanmıştır. Remisyon, tedaviden sonra 10 ay devam etmiştir. Hipogamaglobülinemi beklenen bir kronik toksik etkidir.

Bu deneylerde kullanılan malzemeler ve yöntemler şimdi tarif edilir.

35

Malzemeler ve Yöntemler

Çalışma Prosedürleri

5 Önceden bildirildiği üzere (Milone et al., 2009, Mol Ther, 17: 1453-64) pre-klinik güvenlik testlerine tabi tutulmuş bir kendini-inaktive eden lentiviral vektör (GeMCRIS 0607-793) tasarlanmıştır. T-hücresi preparasyonunun yöntemleri de önceden tarif edilmiştir (Porter et al., 2006, Blood, 107:1325-31). Kantitatif polimeraz-zinciri-reaksiyonu (PCR) analizi, kanda ve kemik iliğinde kimerik antijen reseptörü T

10 hücrelerini saptamak için gerçekleştirilmiştir. Kantifikasyon alt sınırı, standart eğriden belirlenmiştir; kantifikasyon alt sınırının altındaki (yani, kantifiye edilemeyen ancak bildirilen) ortalama değerlerin yaklaşık olduğu düşünülür. Analizin kantifikasyon alt sınırı, genomik DNA'nın mikrogramı için 25 kopyadır.

15 Çözünebilen-faktör analizi, tek kullanım için alikotlara ayrılmış ve -80°C'de saklanmış olan tam kandan ve kemik iliğinden elde edilen serum kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Çözünebilen sitokin faktörlerinin kantifikasyonu, Luminex bilye-dizilim teknolojisinin ve reaktiflerin (Life Technologies) kullanılması ile yapılmıştır.

Aferez #1

12-15 litrelik bir aferez prosedürü, aferez merkezinde yürütülür. Periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) bu prosedür sırasında CART-19 T hücresi üretiminden elde edilir. Bir tek lökaferezden, en az 50×10^9 beyaz kan hücresi CART-19 T

25 hücrelerini üretmek için hasat edilir. Baseline kan lökositleri de elde edilir ve dondurarak-saklanır.

Sito-düşürücü Kemoterapi

30 Kemoterapi, infüzyondan yaklaşık olarak 5-10 gün önce başlatılır, böylece CART-19 hücreleri kemoterapinin tamamlanmasından 1-2 gün sonra verilebilir. Dolayısıyla, kemoterapi başlatılması süresi, rejimin uzunluğuna bağlıdır. Kemoterapinin amacı, CART-19 hücrelerinin yamanmasını ve homeostatik genişlemesini kolaylaştırmak amacıyla lenfopeni indüklemektir. Kemoterapi ayrıca hastalık tümör yükünü azaltmak

35 için de seçilebilir. Sito-düşürücü kemoterapi seçilir ve halk onkologları tarafından

uygulanır. Kemoterapinin seçimi, hastanın altta yatan hastalığına ve önceki terapilere bağlıdır. Burada, adoptif immünoterapiyi kolaylaştırmada bu ajanların kullanılması ile çok deneyim olduğundan, fludarabin (30 mg/m²/gün x 3 gün) ve siklofosfamid (300 mg/m²/gün x 3 gün) seçilen ajanlardır. FDA-onaylı ilaçlar kullanılan, CHOP, HyperCVAD, EPOCH, DHAP, ICE veya diğer rejimlerini içeren, bir kaç başka kabul edilebilir rejim uygundur.

Yeniden evreleme değerlendirilmesi

10 Sınırlı bir yeniden-ifade etme, baseline tümör yükü ölçümü sağlamak amacıyla kemoterapinin tamamlanmasında sonra yapılır. Bu, görüntüleme, fiziksel muayene ve minimal rezidüel hastalık (MRD) değerlendirmelerini içerir. Süteler, ön-infüze etme testleri için aşağıdakilere tabi tutulur: fiziksel muayene, advers olayların belgelenmesi ve hematoloji, kimya ve (uygulanabilir olduğunda) gebelik testleri için kan alımları.

15

CART-19 T hücrelerinin preparasyonu

Otolog T hücrelerine, CD19 için özgüllüğü olan bir ekstraselüler tek zincirli antikör (scFv) eksprese etmesi için mühendislik uygulanır. Ekstraselüler scFv, CD19, maligne hücrelerin yüzeyi üzerine ve normal B hücreleri üzerinde ekspresyon ile sınırlandırılmış bir molekül, eksprese eden hücreler için aktarılmış T hücrelerinin özgüllüğünü yeniden-yönlendirebilir. CD19 scFv'ye ek olarak, hücreler TCR ζ zincirinden ve 4-1BB ve TCR ζ sinyalleme modüllerinden oluşan bir tandem sinyalleme alanından oluşan bir intraselüler sinyalleme molekülünü eksprese etmesi için aktarılır. scFv, bir fare monoklonal antiköründen türetilir ve böylelikle fare dizileri içerir ve sinyalleme alanları bütünüyle natif insan dizileridir. CART-19 T hücreleri, T hücrelerini aferez ile izole etme ile ve scFv:TCR ζ :4-1BB'yi CD4 ve CD8 T hücreleri içine uygulamak için lentiviral vektör teknolojisi (Dropulic et al., 2006, Human Gene Therapy, 17: 577-88; Naldini et al., 1996, Science, 272: 263-7; Dull et al., 1998, J Virol, 72: 8463-71) kullanılarak üretilir.

20 Bazı hastalarda, bir kontrol scFv:TCR ζ :4-1BB, bir kompetitif yeniden-popülasyon deneyi için hücrelerin bir kısmı içine uygulanır. Bu reseptörler, bunların MHC-bağımsız bir şekilde antijen bağlaması açısından "evrenseldir", böylece, bir reseptör yapısı, CD19 antijen-pozitif tümörleri olan hastaların bir popülasyonunu tedavi etmek için kullanılabilir.

35

CAR yapıları, Pensilvanya Üniversitesi'nde geliştirilmiştir ve klinik evre vektör Lentigen Corporation firmasında üretilmiştir. CART-19 hücreleri, Şekil 11'de gösterilen prosese göre Pensilvanya Üniversitesi'nde Klinik Hücre ve Aşı Üretim Tesisi'nde üretilir. Hücre kültürlerinin sonunda, hücreler infüze edilebilir kriyo-vasat içinde dondurularak-saklanır.

5 2,5 x 10⁹ ila 5 x 10⁹ toplam hücre infüzyonu içeren CART-19 aktarılmış T hücrelerinin bir tek dozu, 1 veya 2 torba içinde uygulanır. Her bir torba, aşağıdaki infüze edilebilir grad reaktifler (% hacim/hacim) içeren bir kriyo-vasat alikotu (doza bağlı hacim) içerir: her bir torba içinde 31,25 plazmalit-A, 31,25 dekstroz (%5), 0,45 NaCl, en fazla 7,50 DMSO, 1,00 dekstran 40, yaklaşık olarak 2,5-5 x 10⁹ otolog T hücresi ile 5,00 insan

10 serum albümini. Artmış güvenlik için, birinci doz, hücrelerin gün 0'da ~%10'u, gün 1'de %30'u ve gün 2'de %60'ı ile günler 0'da, 1'de ve 2'de bir yarı doz olarak verilir.

Saklama

15 CART-19-aktarılmış T hücreleri içeren torbalar (10 ila 100 ml kapasite), izlenmiş bir -135°C dondurucu içinde kan bankası koşulları altında saklanır. İnfüzyon torbaları, gerekli olana kadar dondurucu içinde saklanır.

Hücrelerin buzunu-çözme

20

Hücrelerin araştırmasal eczaneye kronolojik olarak kaydedilmesinden sonra, dondurulmuş hücreler, süjenin başucuna kuru buz içinde nakledilir. Hücrelerin buzu, 36°C ila 38°C'de idame ettirilen bir su banyosu kullanılan bir sürede bir başucu torbasında çözülür. Torba, hücrelerin buzu henüz çözülmediğinde, hafifçe ovuşturulur.

25

Kap içinde kalan donmuş parçalar olmamalıdır. CART-19 hücre ürününün bir hasar görmüş veya sızıntı yapan torbaya sahip olduğu görüldüğünde veya aksi durumda bozulduğu görüldüğünde, bu infüze edilmemelidir.

Ön-ilaç Tedavisi

30

T hücresi infüzyonları sonrasında yan etkiler, geçici ateşi üşümleri ve/veya bulantıyı içerebilir. CART-19 hücrelerinin infüzyonundan önce, süjenin ağızdan 650 mg asetaminofen ve ağızdan veya IV 25-50 mg difenhidramin hidroklorür ile ön-ilaç alması tavsiye edilir. Bu ilaçlar, gerektiğinde her altı saatte bir tekrar edilebilir. Hasta

35

asetaminofen ile rahatlatılmayan ateşe sahip olmaya devam ettiğinde, bir non-steroidal

anti-enflamatuvar ilaç kürü reçete edilebilir. Bu T hücreleri üzerinde bir advers etkiye sahip olabildiğinden, yaşamı-tehdit eden bir acil durum dışında, herhangi bir zamanda hastanın sistemik kortikosteroidler, örneğin, hidrokortizon, prednison, prednisolon (Solu-Medrol) veya deksametazon (Decadron), almaması tavsiye edilir.

- 5 Kortikosteroidler bir akut infüzyonel reaksiyon için gerekli olduğunda, 100 mg'lık bir hidrokortizon başlangıç dozu tavsiye edilir.

Uygulama/İnfüzyon

- 10 İnfüzyonlar, kemoterapinin tamamlanmasından 1 ila 2 gün sonra başlar. Birinci infüzyonu gününde, kemoterapi kısmen lenfopeni indüklemesi için verildiğinden, hastalar diferansiyel ile bir CBC'ye, CD3, CD4 ve CD8 sayımlarının değerlendirmesine sahiptir. Herhangi bir özel teori tarafından sınırlandırılmadan, bir başlangıç i.v. 2,5-5x10⁹ CART-19 hücresi dozunun bu protokol için optimal olduğuna inanılır. Sağlıklı bir
- 15 erişkinde yaklaşık 1 x 10¹² T hücresi bulunduğundan, önerilen toplam doz, T hücrelerinin toplam vücut kütlelerinin yaklaşık %0,5'ine eş-değerdir (Roederer, 1995, Nat Med, 1: 621-7; Macallan et al., 2003, Eur J Immunol, 33; 2316-26). Birinci doz, gün 0'da (%10), 1'de (%30) ve 2'de (%60) bir yarık doz kullanılarak uygulanır. Süjeler, bir izole edilmiş odada infüzyon alır. Burada başka yerde tarif edildiği üzere hücrelerin
- 20 buzu hastanın başucunda çözülür. Buzu-çözülmüş hücreler, tolere edildiği kadar çabuk bir şekilde bir infüzyon hızında verilir, böylece infüzyonun süresi yaklaşık olarak 10-15 dakikadır. Aktarılmış T hücreleri, 3-yönlü bir vana ile ayarlı bir 18 çok-ölçekli latekssiz Y-şekilli kan yoluyla dakikada yaklaşık olarak 10 mL ila 20 mL olan bir akış hızında çabuk intravenöz infüzyon ile uygulanır. İnfüzyon süresi, yaklaşık olarak 15 dakikadır.
- 25 CART-19 modifiye edilmiş hücrelerin bir veya iki torbası buz üzerinde aktarılır ve hücrelere soğuk ile süjeye uygulanır. CART-19 hücrelerinin karışımlarını alan süjelerde, karıştırmayı kolaylaştırmak amacıyla, hücreler bir Y-adaptör kullanılarak eş-zamanlı olarak uygulanır. Süjeler infüze edilir ve onlara burada başka yerde tarif edildiği şekilde ön-ilaç verilir. Süjelerin vital bulguları değerlendirilir ve darbe
- 30 oksimetrisi, dozlamdan önce, infüzyonun sonunda ve bundan sonra 1 saat boyunca her 15 dakika bir ve bunlar stabil ve tatmin edici olana kadar yapılır. Baseline CART-19 düzeyinin belirlenmesi için bir kan örneği, infüzyondan önce ve infüzyondan 20 dakika sonra elde edilir. Bunların önceki sito-düşürücü kemoterapisinden toksisiteler yaşayan hastalar, bu toksisiteler çözülene kadar geciktiren infüzyon planlamalarına sahiptir. T
- 35 hücresi infüzyonlarının geciktirilmesini garanti eden spesifik toksisiteler aşağıdakileri

5 içerir: 1) Pulmoner: Satürasyonu %95'in üstünde tutmak için takviye oksijen veya progresif olan göğüs röntgeni üzerindeki radyografik anormallikler varlığı gerekliliği; 2) Kardiyak: Tıbbi yönetim ile kontrol edilmeyen yeni kardiyak aritmi; 3) Kan basıncı arttırıcı desteği gerektiren hipotansiyon; 4) Aktif Enfeksiyon: T hücresi infüzyonunun 48-saati içinde bakteriler, fungus veya virüs için pozitif kan kültürleri. Birinci infüzyondan önce aynı zamanda her bir müteakip infüzyondan iki saat sonra potasyum ve ürik asit için bir serum örneği toplanır.

Greftleme ve devamlılığı değerlendirmek için infüzyon sonrası laboratuvarlar

10

Süjeler serum sitokin düzeyleri ve CART-19 hücrelerinin varlığını değerlendirmek için CART-19 PCR için kan almak amacıyla başlangıç CART-19 hücre infüzyonundan sonra gün 4'te ve 10'da geri döner. Süjeler, aşağıdakilere tabi tutulmak için üç hafta boyunca haftada bir kere geri döner: fiziksel muayene, advers olayların belgelenmesi ve hematoloji ve kimya, CART-19 hücrelerinin yamanması ve devamlılığı ve araştırma laboratuvarları için kan alımları.

15

İkinci infüzyon

20 Herhangi bir özel teori tarafından sınırlandırılmadan, bunların birinci doza yeterli tolerans göstermesi ve yeterli CART-19 hücresinin üretilmesi kaydıyla, CART-19 hücrelerinin bir ikinci dozunun gün 11'de hastalara verilebileceğine inanılır. Doz, 2-5 x 10⁹ toplam hücredir. İnfüzyondan iki saat sonra, potasyum ve ürik asit için bir serum örneği toplanabilir.

25

İkinci aferez

2 litrelik bir aferez prosedürü, aferez merkezinde yapılır, PBMC her bir araştırma için elde edilir ve dondurarak-saklanır. Süjeler aşağıdakilere tabi tutulur: fiziksel muayene, advers olayların belgelenmesi ve hematoloji, kimya, CART-19 hücrelerinin yamanması ve devamlılığı ve araştırma laboratuvarları için kan alımları. Buna ek olarak, tümör yükü ölçümlerini sağlamak amacıyla yeniden-evreleme yapılır. Yeniden-evreleme testleri, hastalık tipi ile belirlenir ve görüntülemeyi, MRD değerlendirmelerini, kemik iliği aspiratının ve biyopsiyi ve/veya lenf nodu biyopsisini içerir.

35

İnfüzyondan 2 ila 6 ay sonra aylık değerlendirmeler

Süjeler, CART-19 hücre infüzyonunun sonrasında 2 ila 6 ay boyunca aylık olarak geri döner. Bu çalışma vizitlerinde, süjeler aşağıdakilere tabi tutulur: eş-zamanlı ilaç verme, fiziksel muayene, advers olayların belgelenmesi ve hematoloji, kimya, CART-19 hücrelerinin yamanması ve devamlılığı ve araştırma laboratuvarı için kan alımları. HIV DNA analizi, saptanabilir RCL'nin varlığını dışlamak için CART-19 hücre infüzyonundan sonra aylar 2-6'da gerçekleştirilir.

İnfüzyondan sonra 2 yıla kadar üç-aylık değerlendirmeler

Süjeler infüzyondan sonra üç aylık bir temelde değerlendirilir. Bu çalışma vizitlerinde, süjeler aşağıdakilere tabi tutulur: eş-zamanlı ilaç verme, fiziksel muayene, advers olayların belgelenmesi ve hematoloji, kimya, CART-19 hücrelerinin yamanması ve devamlılığı ve araştırma laboratuvarı için kan alımları. HIV DNA analizi, saptanabilir RCL'nin varlığını dışlamak için CART-19 hücre infüzyonundan sonra aylar 3'te ve 6'da gerçekleştirilir.

Deneylerin sonuçları şimdi tarif edilir.

20

Hasta öyküsü

Hasta, 1996'da bir evre I CLL tanısı almıştır. Hasta ilk olarak, 6 yıllık gözlemden sonra progresif lökositoz ve adenopati için tedaviye ihtiyaç duymuştur. 200'de, hasta iki siklus rituksimab artı fludarabin ile tedavi edilmiştir; bu tedavi kan sayımlarının normalizasyonu ve adenopatinin parsiyel çözülmesi ile sonuçlanmıştır. 2006'da, hasta, yine kan sayımlarının normalizasyonu ve adenopatinin parsiyel regresyonu ile, hastalık progresyonu için dört siklus rituksimab ve fludarabin almıştır. Bu yanıtı, 20-aylık bir progresyonsuz aralık ve 2-yıllık bir tedavisiz aralık izlemiştir. Şubat 2009'da, hasta çabucak progresif lökositoz ve reküran adenopatiye sahiptir. Hastanın kemik iliği, CLL le kapsamlı bir şekilde infiltre edilmiştir. Sitogenetik analiz, 15 hücrenin 3'ünün bir kromozom 17p silinmesi içerdiğini göstermiştir ve flüoresans *in situ* hibridizasyon (FISH) testleri, 200 hücrenin 170'inin, kromozom 17p üzerinde TP53'ü içeren bir silinmeye sahip olduğunu göstermiştir. Hasta, bir siklus için bendamustin ile rituksimab ve üç ilave siklus (şiddetli bir alerjik reaksiyondan dolayı) rituksimab olmadan

35

bendamustin almıştır. Bu tedavi, lökositozda yalnızca geçici iyileşme ile sonuçlanmıştır. Progresif adenopati, terapiden sonra bilgisayarlı tomografi (BT) vasıtasıyla belgelenmiştir.

- 5 Otolog T hücreler, lökaferez vasıtasıyla toplanmıştır ve dondurarak-korunmuştur. Akabinde, hasta iyileştirilmiş hematopoiez ve adenopatinin parsiyel bir çözülmesi ile, 11 hafta boyunca alemtuzumab (bir anti-CD52, matür-lenfosit, hücre-yüzeyi antijeni) almıştır. Sonraki 6 ay boyunca, hasta inatçı, kapsamlı ilik tutulumu ve multipl 1- ila 3-
- 10 hasta kimerik antijen reseptörü-modifiye edilmiş T hücrelerinin bir faz 1 klinik çalışmaya kaydedilmiştir.

Hücre İnfüzyonları

- 15 Hastadan elde edilen otolog T hücrelerinin buzu çözülmüştür ve CD19-spesifik kimerik antijen reseptörü eksprese etmesi için lentivirüs ile aktarılmıştır (Şekil 12A); lentiviral vektör için dizi tanımlayıcıları ve ilgili diziler Tablo 5'te gösterilir. Hücre infüzyonundan dört gün önce, hasta rituksimab olmadan lenfositlerin tüketilmesi için tasarlanan kemoterapi (vücut yüzey alanının metre karesi için 4 mg olan bir dozda pentostatın ve
- 20 metre kare için 600 mg olan bir dozda siklofosfamid) almıştır (Lamanna et al., 2006, J Clin Oncol, 24: 1575-81). Kemoterapiden üç gün sonra ancak hücre infüzyonundan önce, kemik iliği CLL tarafından yaklaşık %40 tutulum ile hiper-hücrelidir. Lösemi hücreleri kappa hafif zincirini ve CD5, CD19, CD20 ve CD23 ekprese etmiştir. Sitogenetik analiz, her ikisi de kromozom 17p ve *TP53* lokus
- 25 (46,XY,del(17)(p12)[51/46,XY,der(17)t(17;21)(q10;q10)[5]/46,XY[14]) kaybı ile sonuçlanan, iki ayrı klon göstermiştir. Kemoterapiden dört gün sonra, hasta peş peşe üç günlük intravenöz infüzyona ayrılan (gün 1'de %10, gün 2'de %30 ve gün 3'te %60) toplamda $1,42 \times 10^7$ aktarılmış hücre ($1,46 \times 10^5$ hücre/kilogram) için, %5'i aktarılmış olan toplamda 3×10^8 T hücresi almıştır. İnfüzyon-sonrasında sitokin uygulanmamıştır.
- 30 İnfüzyonların toksik etkileri bildirilmemiştir.

Tablo 5: pELPS-CD19-BBz transfer vektörü için dizi tanımlayıcıları

SEQ ID NO: # KİMLİK

SEQ ID NO: 1 pELPS-CD19-BBZ transfer vektörü (nükleik asit dizisi)

SEQ ID NO: #	KİMLİK
SEQ ID NO: 2	RSV's U3 (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 3	HIV R tekrarı (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 4	HIV U5 Tekrarı (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 5	Parsiyel Gag/Pol (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 6	cPPT (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 7	EF1 alfa Promotörü (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 8	CD 19-BBzeta CAR (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 9	Hu Dağ Sıçanı PRE (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 10	R Tekrarı (nükleik asit dizisi)t
SEQ ID NO: 11	U5 Tekrarı (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 12	CD19-BB-zeta CAR (amino asit dizisi)
SEQ ID NO: 13	CD8 Leader- (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 14	Anti-CD19scFv (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 15	CD8 Menteşe (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 16	CD8 Transmembran (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 17	4-1BB (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 18	CD3-zeta (nükleik asit dizisi)
SEQ ID NO: 19	CD8 Ön-bilgi (amino asit dizisi)
SEQ ID NO: 20	Anti-CD19scFv (amino asit dizisi)
SEQ ID NO: 21	CD8 Menteşe (amino asit dizisi)
SEQ ID NO: 22	CD8 Transmembran (amino asit dizisi)
SEQ ID NO: 23	4-1BB (amino asit dizisi)
SEQ ID NO: 24	CD3-zeta (amino asit dizisi)

Klinik Yanıt ve Değerlendirmeler

Birinci infüzyondan on dört gün sonra, hasta grad 2 yorgunluk ile ilişkili üşümelere ve düşük-grad ateşlere sahip olmaya başlamıştır. Sonraki 5 gün boyunca, üşümelere yoğunlaşmıştır ve hastanın sıcaklığı, rigörler, diyforez, aneroxi, bulantı ve diyare ile ilişkili olarak, 39,2°C'ye (102,5°F) yükselmiştir. Hasta, respiratuvar veya kardiyak semptomlara sahip değildir. Ateşlerden dolayı, göğüs radyografisi ve kan, idrar ve gaita kültürleri yapılmıştır ve tümü negatif veya normaldir. Tümör lizis sendromu tanısı infüzyondan sonra gün 22'de koyulmuştur (Şekil 12B). Ürik asit düzeyi, 10,6 mg-desilitredir (630,5 µmol/litre), fosfor düzeyi 4,7 mg/desilitredir (1,5 mmol/litre) (normal aralık, 2,4 ila 4,7 mg/desilitre [0,8 ila 1,5 mmol/litre]), ve laktat dehidrojenaz düzeyi 1130 U/litredir (normal aralık, 98 ila 192). 2,60 mg/desilitre (229,8 µmol/litre) (baseline düzeyi, <1,0 mg/desilitre [<88,4 µmol/litre]) olan bir kreatinin düzeyi ile, akut böbrek hasarı bulgusu vardır. Hasta, hastaneye yatırılmıştır ve resüsitasyon ve rasburikaz ile tedavi edilmiştir. Ürik asit düzeyi 24 saat içinde ve kreatinin düzeyi 3 gün içinde normal aralığa dönmüştür; hasta hastanedeki gün 4'te taburcu edilmiştir. Laktat dehidrojenaz düzeyi, sonraki ay boyunca normal hâle gelerek, kademeli olarak düşmüştür.

CART19-hücre infüzyonundan sonra gün 28 ile, adenopati artık palpabl değildir ve gün 23'te, kemik iliğinde CLL bulgusu yoktur (Şekil 12C). Karyotip, 15 hücrenin 15'inde normaldir (46, XY) ve FISH testi incelenen 200 hücrenin 198'inde *TP53* silinmesi için negatiftir; bunun negatif kontrollerde normal sınırlar içinde olduğunu düşünülür. Akış-sitometrik analiz, rezidüel CLL göstermemiştir ve B hücreleri saptanabilir değildir (CD5+CD10-CD19+CD23+ lenfosit kapısı içindeki hücrelerin <%1'i). İnfüzyondan sonra gün 31'de yapılan BT taraması, adenopatinin çözülmesini göstermiştir (Şekil 12D).

CART19-hücre infüzyonundan üç ve 6 ay sonra, palpabl adenopati olmadan, fiziksel muayene önemsiz kalmıştır ve CART19-hücre infüzyondan 3 ay sonra gerçekleştirilen BT taraması sürdürülmüş remisyon göstermiştir (Şekil 12D). 3 ve 6 ayda kemik iliği çalışmaları da, ayrıca normal B hücrelerinin devam eden bir yokluğu ile, morfoloji analizi, karyotip analizi (46, XY) veya akış-sitometrik analiz vasıtasıyla CLL bulgusu olmadığını da göstermiştir. Remisyon, en az 10 ay boyunca sürdürülmüştür.

CART19 Hücrelerinin Toksisitesi

Hücre infüzyonları, akut toksik etkilere sahip değildir. Bildirilen tek ciddi (grad 3 veya 4) advers olay, yukarıda tarif edilen grad 3 tümör lizis sendromudur. Hasta, baseline'da

grad 1 lenfopeniye ve gün 1'de başlayan ve terapiden sonra en az 10 aya kadar devam eden grad 2 veya 3 lenfopeniye sahiptir. Milimetre küp için 140 hücre olan bir mutlak lenfosit sayısı ile, Grad 3 lenfopeni, gün 19'da kaydedilmiştir, ancak gün 22'den en az 10 aya kadar, mutlak lenfosit sayısı, milimetre küp için 390 ve 780 hücre (grad 2 veya 3 lenfopeni) aralığındadır. Hasta, gün 19'dan gün 26'ya kadar geçici grad 1 trombositopeniye (platelet sayısı, 98.000 ila 131.000/milimetre küp) ve gün 17'den gün 33'e kadar grad 1 veya 2 nötropeniye (mutlak nötrofil sayısı, 1090 ila 1630/milimetre küp) sahiptir. Büyük olasılıkla çalışma tedavisi ile ilgili olan diğer bulgular ve semptomlar, birinci infüzyondan 17 gün sonra geliştirilen ve gün 33 ile çözülen, aminotransferaz ve alkalın fosfataz düzeylerinde grad 1 ve 2 yükselmeleri içermiştir. Grad 1 ve 2 konstitüsyonel semptomları, ateşlerden, üşümelerden, diyaferezden, miyaljilerden, baş ağrısından ve yorgunluktan oluşmuştur. Grad 2 hipogamaglobülinemi, intravenöz immün globülin infüzyonları ile düzeltilmiştir.

15 **Serum ve Kemik İliği Sitokinlerinin Analizi**

Hastanın klinik yanıtına, baseline düzeylerinden 160 kat kat kadar yüksek olan interferon- γ , interferon- γ -yanıt verici kemokinler CXCL9 ve CXCL10 ve interlökin-6 düzeyleri ile, enflamatuvar sitokinlerin düzeylerinde geciktirilmiştir bir artış eşlik eder (Şekil 13A ila Şekil 13D). Sitokin düzeylerindeki temporal yükselme, birinci CART19-hücre infüzyondan sonra 17 ila 23 günde pik yapan, klinik semptomlara paraleldir.

Seri kemik iliği aspiratlarından süpernatantlar, sitokinler için ölçülmüştür ve immün aktivasyon bulgusu göstermiştir (Şekil 13E). T-hücresi infüzyonundan önceki gündeki baseline düzeyleri ile karşılaştırıldığında, interferon- γ , CXCL9, interlökin-6 ve çözünebilir interlökin-2 reseptöründeki anlamlı artışlar bildirilmiştir; değerler birinci CART19-hücre infüzyonundan sonra gün 23'te pik yapmıştır. Kemik iliği sitokinlerindeki artış, ilikten elde edilen lösemi hücrelerinin eliminasyonu ile kesilmiştir. Serum ve ilik tümör nekroz faktörü α değişmeden kalmıştır.

30

Kimerik Antijen Reseptörü T Hücrelerinin Genişlemesi ve Devamlılığı

Gerçek-zamanlı PCR; birinci infüzyondan sonra gün 1'de başlayan anti-CD 19 kimerik antijen reseptörünü (CAR19) şifreleyen DNA'yı saptamıştır (Şekil 14A). Hücrelerin 3-logtan fazla olan bir *in vivo* genişlemesi, infüzyondan sonra gün 21'de bildirilmiştir. Pik

35

düzeylerinde, kandaki CART19 hücreleri, dolaşımdaki lenfositlerin %20'den fazlasına tekabül etmiştir; bu pik düzeyleri konstitüsyonel semptomların, tümör lizis sendromunun (Şekil 12B) ve serum sitokin düzeylerinde yükselmelerin (Şekil 13A ila Şekil 13D) meydana gelişi ile kesişmiştir. Değerlerin pik düzeylerinden 10'luk bir faktör ile düşmesine rağmen, CART19 hücreleri infüzyonlardan 6 ay sonra yüksek düzeylerde saptanabilir olarak kalmıştır. Kandaki kimerik antijen reseptörü T hücrelerinin iki katına çıkma süresi, 31 günlük bir eliminasyon yarı-ömrü ile, yaklaşık olarak 1,2 gündür.

Kemik İliği içinde Kimerik Antijen Reseptörü T Hücreleri

10

CART 19 hücreleri, birinci infüzyondan 23 gün sonra başlayarak kemik iliği numunelerinde tanımlanmıştır (Şekil 14B9 ve 34 günlük bir düşüş yarı-ömrü ile, en az 6 ay boyunca kalmaya devam etmiştir. Kemik iliği içinde CART19 hücrelerinin en yüksek düzeyleri, birinci infüzyondan 23 gün sonra birinci değerlendirmede tanımlanmıştır ve sitokin-salgılama profilleri ile gösterildiği üzere (Şekil 13E) bir immün yanıtın indüksiyonu ile kesişmiştir. Kemik iliği aspiratlarının akış-sitometrik analizi, baseline'da CD5+CD19+ hücrelerinin bir klonal genişlemesini göstermiştir, bu infüzyondan 1 ay sonra ve infüzyondan 3 ay sonra elde edilen bir örnekte (veriler gösterilmemiştir) yoktur. Normal B hücreleri, tedaviden sonra saptanmamıştır (Şekil 14C).

20

Otolog genetik olarak modifiye edilmiş CART19 hücreleri ile tedavi

Burada, CD3-zeta ve CD137 (4-1BB) sinyalleme alanlarına bağlı anti-CD19 eksprese eden bir lentivirüs vektörü ile transdüksiyon yoluyla CD 19'u hedef alması için genetik olarak modifiye edilmiş otolog T hücreleri ile tedaviden 3 hafta sonra tümör lizis sendromunun gecikmiş gelişmesi ve bir tam yanıt tarif edilir. Genetik olarak modifiye edilmiş hücreler, infüzyondan sonra en az 6 ay boyunca kemik iliğinde yüksek düzeylerde mevcuttur. Kemik iliği içinde bir CD19-spesifik immün yanıtın üretilmesi, temporal sitokin salımı ve kimerik antijen reseptör T hücrelerinin pik infiltrasyonu ile kesişen lösemi hücreleri ablasyonu ile gösterilmiştir. Hücrel immünoterapiden sonra tümör lizis sendromunun gelişmesi önceden bildirilmemiştir (Baeksgaard et al., 2003, Cancer Chemother Pharmacol, 51: 187-92).

Otolog T hücrelerinin hedef spesifik tümör antijenlerine genetik manipülasyonu, kanser terapisi için çekici bir stratejidir (Sadelain et al., 2009, Curr Opin Immunol, 21: 215-23;

35

Jena et al., 2010, Blood, 116: 1035-44). Burada tarif edilen yaklaşımın önemli bir özelliği, kimerik antijen reseptörü T hücrelerinin HLA ile sınırlandırılmamış bir şekilde tümör hedeflerini tanınması, böylece "satışa hazır" kimerik antijen reseptörlerinin çok çeşitli histolojik özellikleri olan tümörler için yapılabilmesidir. HIV-kaynaklı lentiviral vektörler, kanser terapisi için kullanılır, bu retroviral vektörlerin kullanılmasına kıyasla bazı avantajlara sahip olabilen bir yaklaşımdır (June et al., 2009, Nat Rev Immunol, 9: 704-16).

Kimerik antijen reseptörü T hücrelerinin önceki çalışmalarında, objektif tümör yanıtları ılımlıdır ve modifiye edilmiş hücrelerin *in vivo* proliferasyonu sürdürülmemiştir (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res, 12: 6106-15; Till et al., 2008, Blood, 112: 2261-71; Pule et al., 2008, Nat Med, 14: 1264-70). Brentjens ve iş arkadaşları, bir CD28 sinyalleme alanına bağlı olan CD19-hedefli kimerik antijen reseptörlerinin klinik bir çalışmasının preliner sonuçlarını bildirmiştir ve ileri CLL'si olan üç hastanın ikisinde geçici tümör yanıtları bulmuştur (Brentjens et al., 2010, Mol Ther, 18: 666-8); buna rağmen, kimerik antijen reseptörleri dolaşımdan çabucak kaybolmuştur.

Kimerik antijen reseptörü T hücrelerinin infüze edilmiş çok düşük dozunun klinik olarak aşikâr bir anti-tümör yanıtı ile sonuçlanması beklenmemiştir. Gerçekte, $1,5 \times 10^5$ kimerik antijen reseptörü T hücresi/kilogram olan infüze edilmiş doz, kimerik antijen reseptörleri veya transgenik T-hücresi reseptörleri eksprese etmesi için modifiye edilmiş T hücrelerinin önce çalışmalarında kullanılan dozların bir kaç büyüklük mertebesi altındadır (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res, 12: 6106-15; Brentjens et al., 2010, Mol Ther, 18: 666-8; Morgan et al., 2010, Mol Ther, 18: 843-51; Johnson et al., 2009, Blood, 114: 535-46). Herhangi bir özel teori tarafından engellenmeden, kemoterapinin kimerik antijen reseptörünün etkilerini arttırabileceği spekülasyonu yapılır.

Hastanın kanında ve kemik iliğinde CART19 hücrelerinin uzatılmış devamlılığı, 4-1BB sinyalleme alanının dâhil edilmesinden kaynaklanır. Mürin dizileri içeren tek-zincirli Fv antikor fragmanı eksprese eden CART 19 hücreleri reddedilmediğinden, normal B hücrelerinin CART19-hücresi-aracılı eliminasyonunun kimerik antijen reseptörüne immünolojik toleransın indüksiyonunu kolaylaştırması olasıdır. Bu hastada saptanabilir CD19-pozitif lösemi hücrelerinin yokluğu göz önüne alındığında ve herhangi bir özel teori tarafından engellenmeden, kimerik antijen reseptörü Bunlar kemik iliği içinde

ortaya çıkmaya başladığından, T hücrelerinin homeostazının en azından kısmen erken B-hücresi progenitörleri tarafından aktarılan stimülasyondan elde edilmesi mümkündür. Buluş, yeni bir mekanizmasının "hafıza" kimerik antijen reseptörü T hücrelerini idame ettirmek için var olabildiği keşfi ile ilgilidir.

5

CD19'un normal ve maligne B hücreleri ile sınırlı ekspresyon ile, çekici bir tümör hedef olmasına rağmen, burada kimerik antijen reseptörü T hücrelerinin devamlılığının uzun-sürelili B-hücresi yetmezliğine aracılık edebileceği endişesi vardır. Gerçekte, hastada, b hücreleri, infüzyondan sonra en az 6 ay boyunca kanda ve kemik iliğinde yoktur. Bu hasta reküran enfeksiyonlara sahip değildir. B hücrelerini CD20 yoluyla rituksimab ile hedefleme, B-hücresi neoplazmları olan hastalar için bir etkili ve görece güvenli stratejidir ve uzun-sürelili B-hücresi lenfopenisi, yönetilebilir (Molina, 2008, Ann Rev Med, 59: 237-50). Rituksimab ile tedavi edilen hastaların terapinin kesilmesinden sonraki aylar içinde bir B hücresi dönüşüne sahip olduğu bildirilmiştir. Bu tarz geri-

15 kazanımın anti-B-hücresi T hücrelerinin *in vivo* kalmaya devam ettiği hastalarda gerçekleşip gerçekleşmediği henüz belli değildir.

TP53 silinmeleri ile CLL'ye sahip olan hastalar standart terapilerden sonra kısa remisyonlara sahiptir (Dohner et al., 1995, Blood, 85: 1580-9). Allojeneik kemik iliği nakli, ileri CLL'si olan hastalarda uzun-sürelili remisyonları indükleyen tek yaklaşımdır (Gribben et al., 2011, Biol Blood Marrow Transplant, 17: Suppl:S63-S70). Buna rağmen, elde edilen güçlü graft-versus-tümör etkisi, kronik graft-versus-host hastalığının yüksek frekansından dolayı, kayda değer morbidite ile ilişkilidir, bu sıklıkla özellikle, tipik olarak CLL'den etkilenmiş olan daha yaşlı hastalarda şiddetlidir (Gribben et al., 2011, Biol Blood Marrow Transplant, 17: Suppl:S63-S70; Sorrow et al., 2008, Blood, 111: 446-52). Burada sunulan veriler, genetik olarak modifiye edilmiş otolog T hücrelerinin bu sınırlandırmayı alt edebileceğini öne sürer.

Güçlü *in vivo* kimerik antijen reseptörü T-hücresi genişlemesi ve öne çıkan anti-lösemi aktivitesi ile birleştirilmiş, tümör lizis sedromunun ve sitokin salımının geciktirilmiş başlaması, CART19 hücrelerinin kayda değer ve sürdürülmüş efektör fonksiyonlarını işaret eder. Burada tarif edilen deneyler, bu terapinin potensini vurgular ve güçlü sinyalleme alanlarına bağlı olan bir kimerik antijen reseptörünün transdüksiyonu yoluyla CD 19'u (ve diğer hedefleri) hedef alması için genetik olarak modifiye edilmiş otolog T

35 hücrelerinin detaylı çalışması için destek sağlar. Antikor-aracılı terapiden farklı olarak,

kimerik antijen reseptörü-aracılı t hücreleri, in vivo çoğalma potansiyeline sahiptir ve uzun-sürelili devamlılık sürdürülmüş tümör kontrolüne yol açabilir. İleri CLL'si olan iki diğer hasta ayrıca, bu protokole göre CART 19 infüzyonları da almıştır ve üçünün tümü tümör yanıtına sahiptir. Bu bulgular, B-hücresi neoplazmları için CD19-yeniden-yönlendirilmiş T hücrelerinin devam eden çalışmasını garanti eder.

DİZİ LİSTESİ

- <110> The Trustees of the University of Pennsylvania
June, Carl H
- 10 Porter, David L
Kalos, Michael
Levine, Bruce L
- <120> KANSERİ TEDAVİ ETMEK İÇİN KİMERİK ANTİJEN RESEPTÖRÜ-MODİFİYE EDİLMİŞ T HÜCRELERİNİN KULLANILMASI
- 15 <130> 46483-6001-00-WO.601218
<150> 61/421,470
<151> 2010-12-09
<150> 61/502,649
<151> 2010-06-29
- 20 <160> 27
<170> PatentIn versiyon 3.5
<210> 1
<211> 9174
<212> DNA
- 25 <213> Yapay Dizi
<220>
<223> Kimyasal Olarak Sentezlenmiş

	<212> DNA	
	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
	<223> Kimyasal Olarak Sentezlenmiş	
5	<400> 10	
	gaatgacat ggttggcaga ggcctcagac cagcagatct cagcagcact cagcagatca	60
	g ggtcagac ccaatcagc ctcaactg cagcgcac	75
	<210> 11	
	<211> 84	
	<212> DNA	
10	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
	<223> Kimyasal Olarak Sentezlenmiş	
	<400> 11	
	atgagcagc gcaactctgt cagctgacac ctctcctcag cggctcgc ca cagcctctctt	66
	ctctcctcag cagctctctc ccaac	84
15	<210> 12	
	<211> 486	
	<212> PRT	
	<213> Yapay Dizi	
	<220>	
20	<223> Kimyasal Olarak Sentezlenmiş	
	<400> 12	
	Met Ala Leu Arg Val Thr Ser Leu Leu Leu Thr Thr Ala Leu Leu Ala Val	
	1 5 10 15 20 25	
	His Ala Ala Arg Arg Arg Ile Glu Met Ser Glu Thr Thr Ser Ser Leu	
	30 35 40 45 50	
	Glu Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Thr Thr Cys Arg Ala Ser Glu	
	55 60 65 70 75	
	Met Ile Thr Gly Tyr Tyr Leu Ala Asp Tyr Tyr Ala Val Tyr Thr Asp Gly Ser	
	80 85 90 95 100	
	Val Tyr Leu Leu Thr Tyr Leu Thr Ser Arg Thr Thr Ser Gly Val Thr	
	105 110 115 120 125	
	Phe Arg Thr Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Thr	
	130 135 140 145 150	
	Leu Arg Ser Gly Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Thr Thr Tyr Glu Thr Glu Gly	
	155 160 165 170 175	
	Arg Thr Ser Ser Tyr Thr Thr Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Leu Thr Thr Thr	
	180 185 190 195 200	

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141

Val Lys Leu Val Ala Ser Gly Phe Gly Ile Val Val Ala Pro Ser Ile Ser
 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152

Leu Ser Val Thr Asp Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Asp Asp Lys Gly
 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163

Val Ser Asp Ile Asp Glu Phe Thr Asp Lys Gly Leu Glu Thr Leu Gly
 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174

Val Ile Asp Gly Ser Glu Thr Glu Asp Thr Ala Ser Ala Ser Lys Ser
 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185

Asp Leu Thr Leu Ile Lys Ser Asn Ser Lys Val Glu Val Glu Leu Ser
 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196

His Asn Ser Leu Ala Thr Asp Asn Thr Glu Thr Asp Lys Lys Ala Lys
 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207

His Asp Lys Phe Gly Gly Ser Lys Ala Ser Asp Lys Thr Thr Gly Gly
 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218

Val Ser Val Thr Val Ser Ser His Ser Thr Thr Ala Thr Ser Phe Thr
 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229

Val Phe Ala Ile Thr Thr Ala Ser Glu Phe Leu Ser Leu Asp Thr Gly
 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240

Ala Lys Asp Phe Ala Ala Gly Gly Ala Val Ser Thr Asp Gly Leu Asp
 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251

Phe Ala Lys Asp Ile Thr Thr Thr Asp Ala Ser Thr Ala Gly Thr Lys Gly
 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262

Val Leu Thr Thr Thr Ser Thr Val Thr Ser Leu Lys Lys Lys Gly Gly Asp
 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273

Lys Lys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285

Thr Thr Thr Glu Glu Asp Thr Lys Thr Lys Asp Thr Thr Glu Thr Thr
 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296

Thr Gly Gly Lys Glu Leu Ala Val Lys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307

Thr Ala Lys Lys Lys Glu Gly Ser Ser Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318

Gly Arg Asp Glu Glu Thr Ala Val Thr Asp Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330

Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342

Thr Asp Glu Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

Argüstenin enjeksiyonlu kullanımı için uygunluk araştırması yapılmıştır. 100

Argüstenin enjeksiyonlu kullanımı için uygunluk araştırması yapılmıştır. 100

<210> 19

<211> 21

5

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Kimyasal Olarak Sentezlenmiş

<400> 19

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

10

His Ala Ala Arg Pro
20

<210> 20

<211> 242

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

15

<220>

<223> Kimyasal Olarak Sentezlenmiş

<400> 20

Arg Ile Glu Met Thr Glu Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Arg Asp Val Thr Ile Ser Lys Arg Ala Ser Leu Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Thr Ser Trp Thr Ser Gly Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Gly His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60 65

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Ser Thr Ile Ser Asp Ser Gly Glu
70 75 80 85

Ala Ser Thr Ala Thr Ser Thr Thr Ser Gly Ser Thr Thr Thr Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Ser Gly Ile Thr Gly Gly Gly Tyr Ser
100 105 110

Gly Gly Gly His Ser Gly Gly Gly Gly Thr Ser Val Lys Leu Thr Gly
115 120 125

Ser Gly Pro Gly Thr Val Ala Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
130 135 140 145

Thr Val Ser Gly Val Ser Ser Pro Asp Tyr Gly Val Ser Thr Thr Thr Arg
145 150 155 160

Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser
 165 170 175
 Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile
 180 185 190
 Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln
 195 200 205
 Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
 210 215 220
 Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser

<210> 21

<211> 47

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Kimyasal Olarak Sentezlenmiş

<400> 21

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr
 35 40 45

10 <210> 22

<211> 22

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

15 <220>

<223> Kimyasal Olarak Sentezlenmiş

<400> 22

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 20

<210> 23

20 <211> 42

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Kimyasal Olarak Sentezlenmiş

<400> 23

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40

5

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

10

<223> Kimyasal Olarak Sentezlenmiş

<400> 24

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 25

<211> 22

15

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Kimyasal Olarak Sentezlenmiş

<400> 25

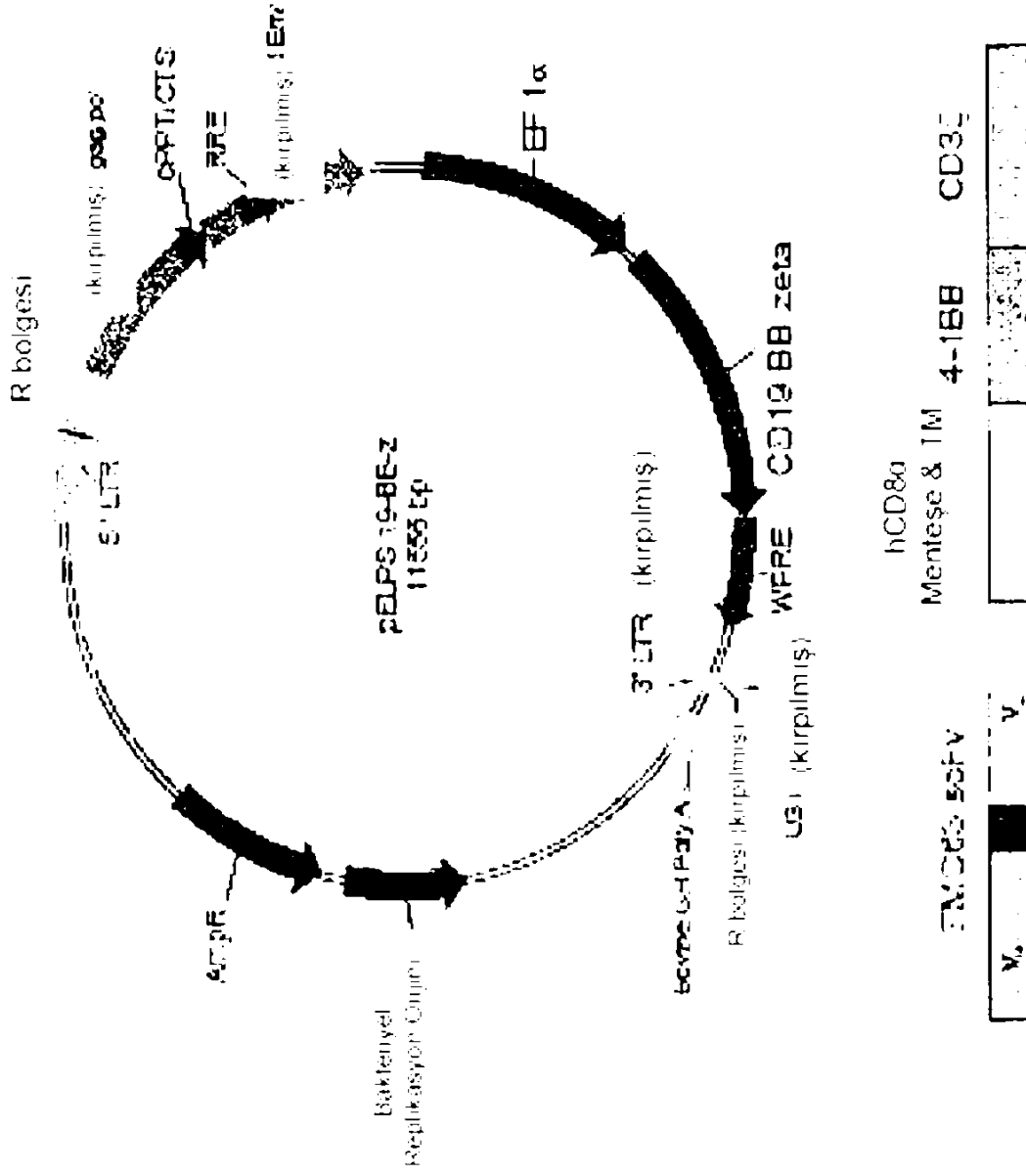
20

gaaagctgac tgcccctatt tg 22

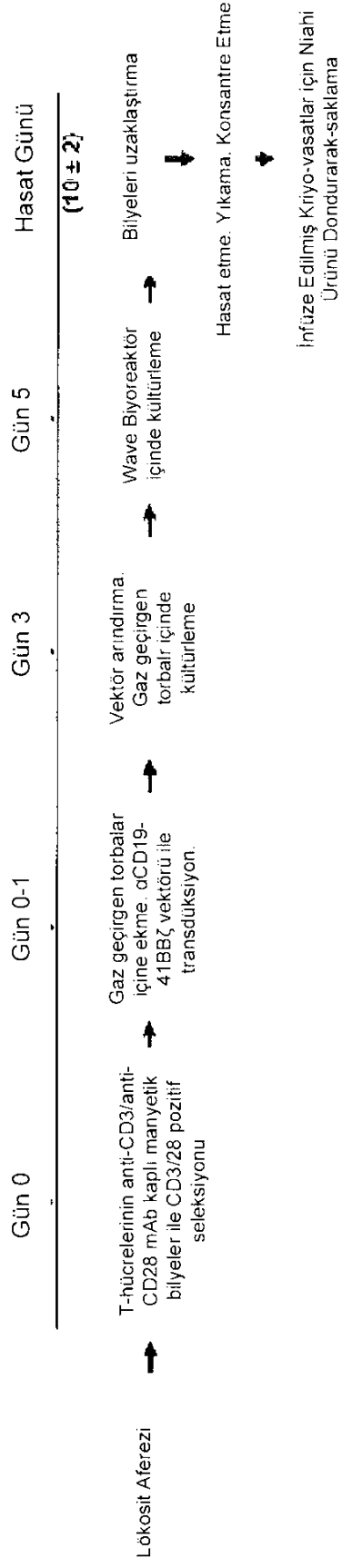
<210> 26

<211> 22

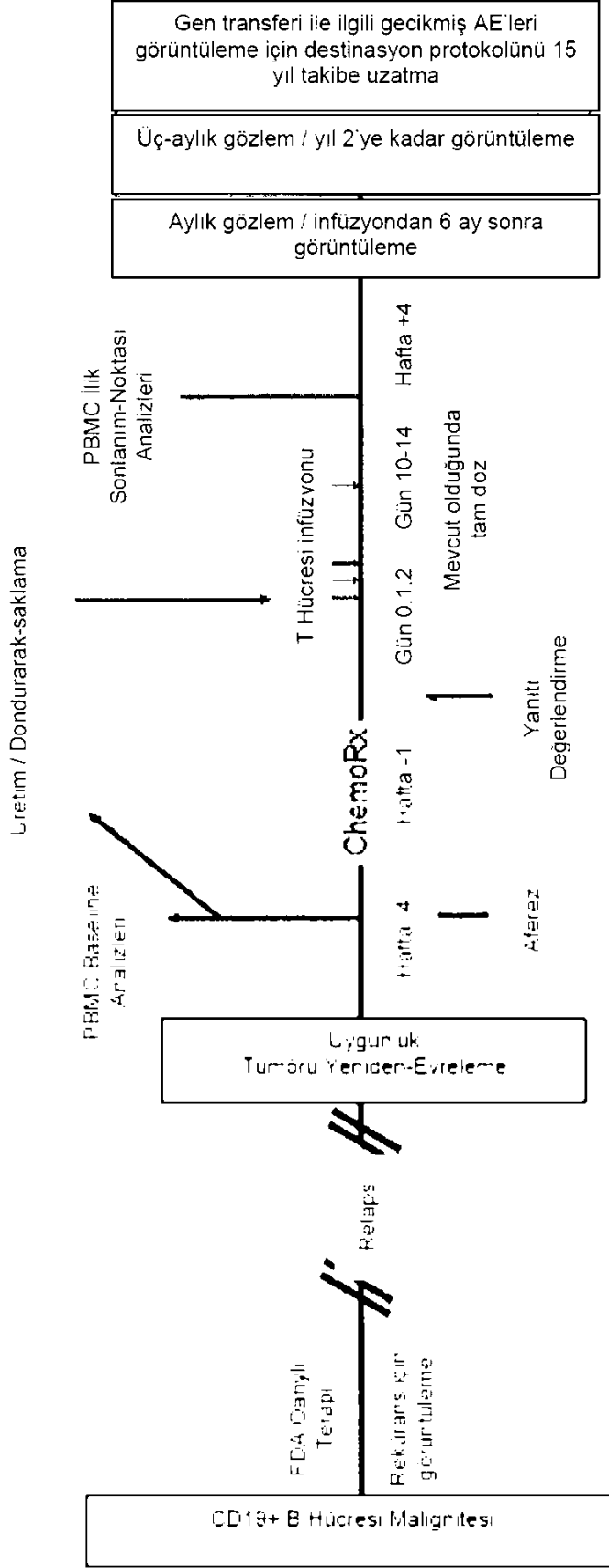
<212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Kimyasal Olarak Sentezlenmiş
 5 <400> 26
 gagaggaagt gctggaaca at 22
 <210> 27
 <211> 15
 <212> DNA
 10 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> Kimyasal Olarak Sentezlenmiş
 <400> 27
 ctccccagtc tcttt 15



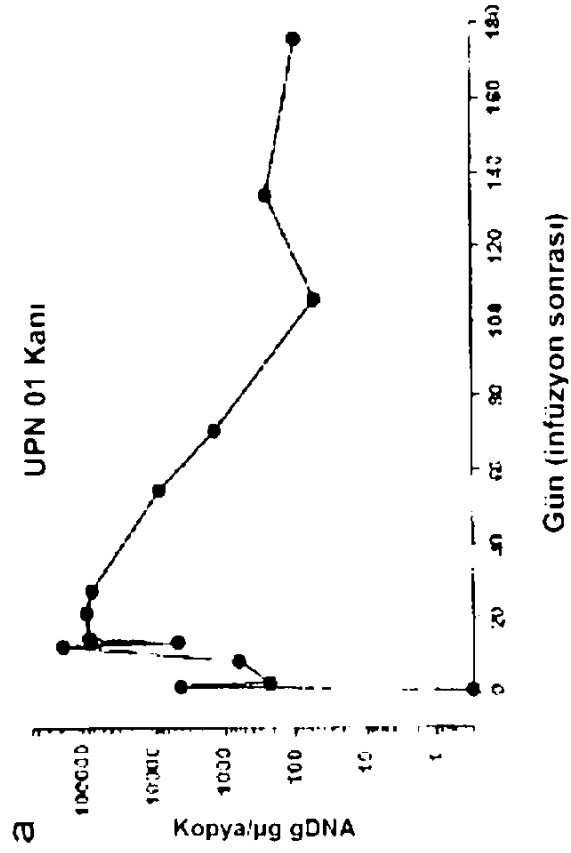
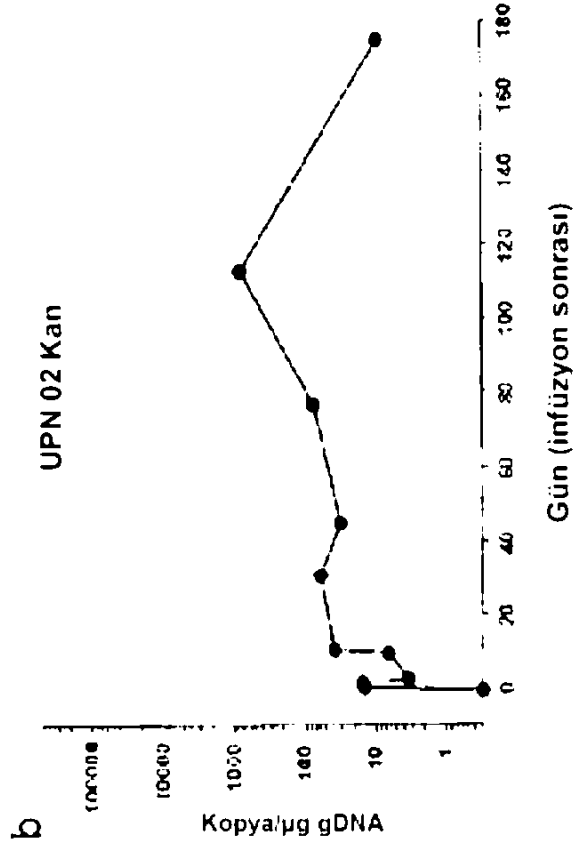
Şekil 1A



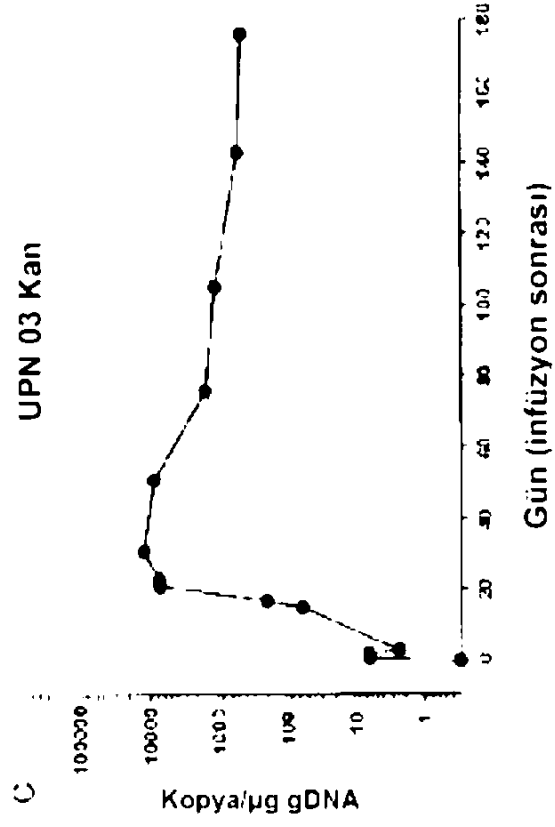
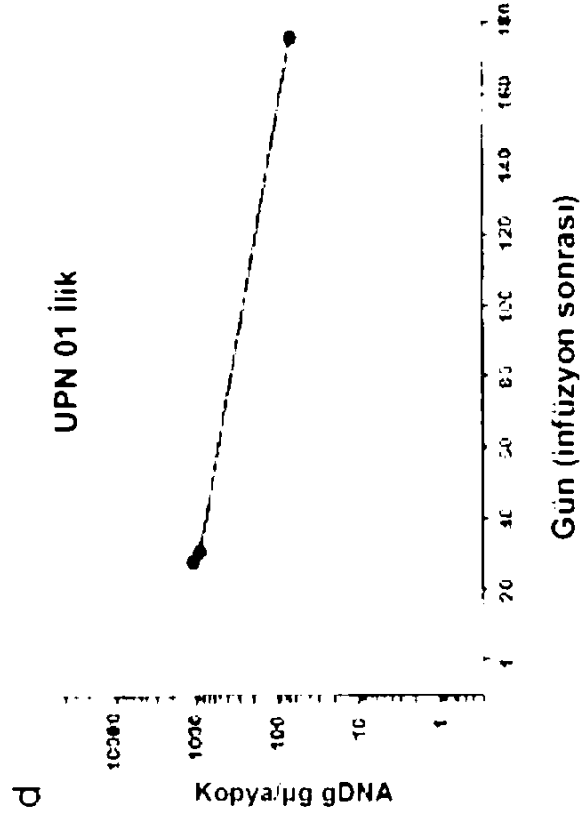
Şekil 1B



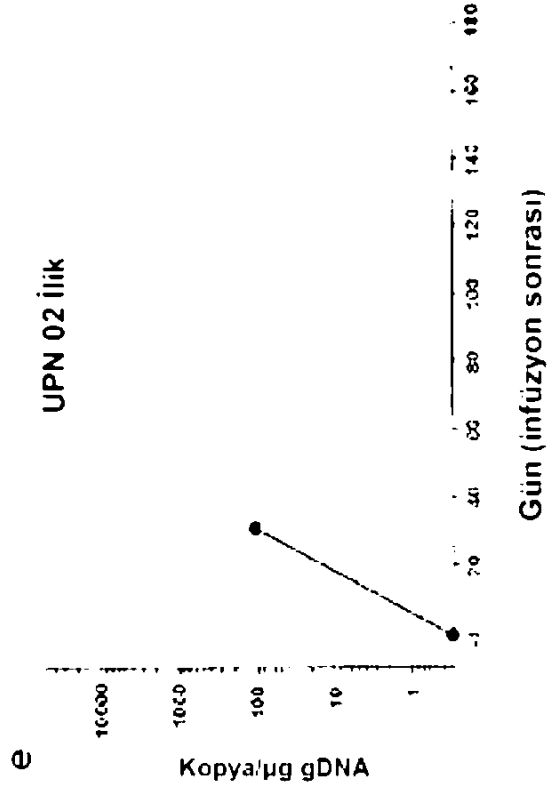
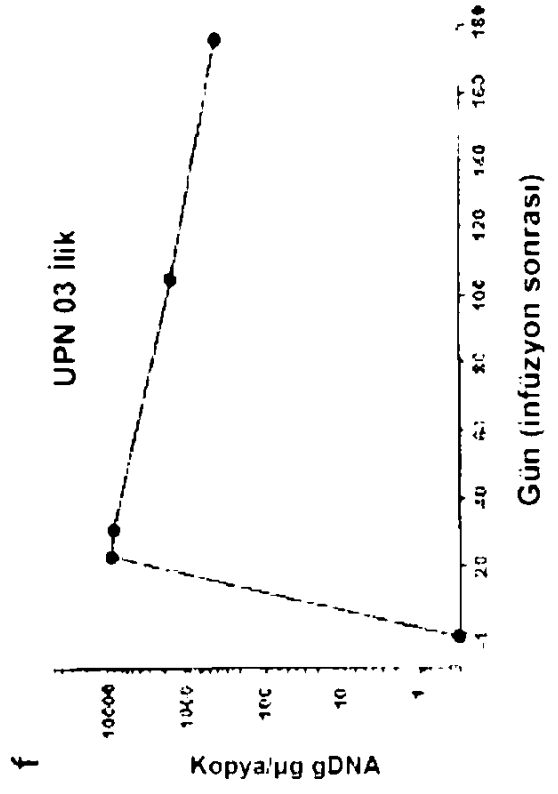
Şekil 1C



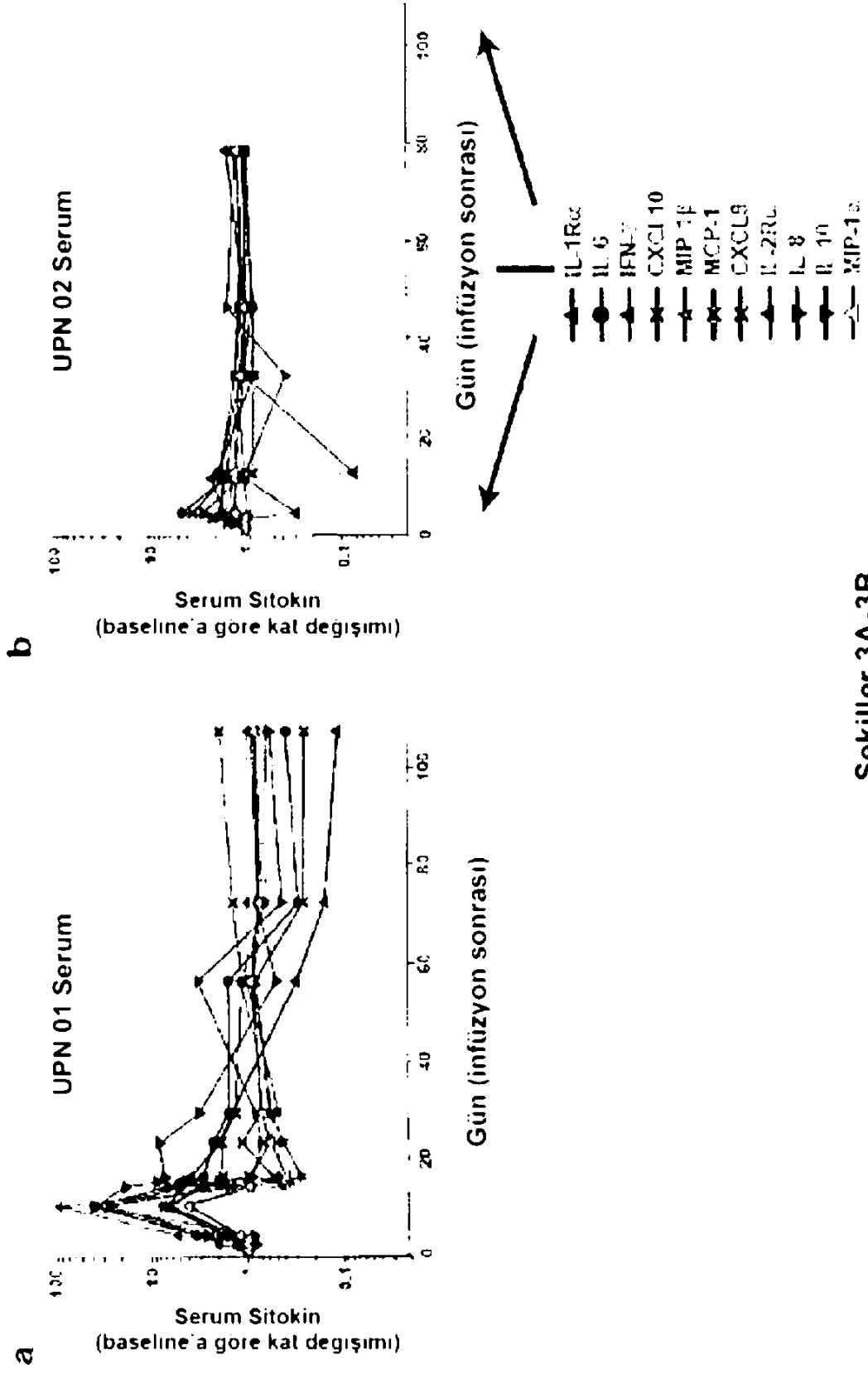
Şekiller 2A-2B



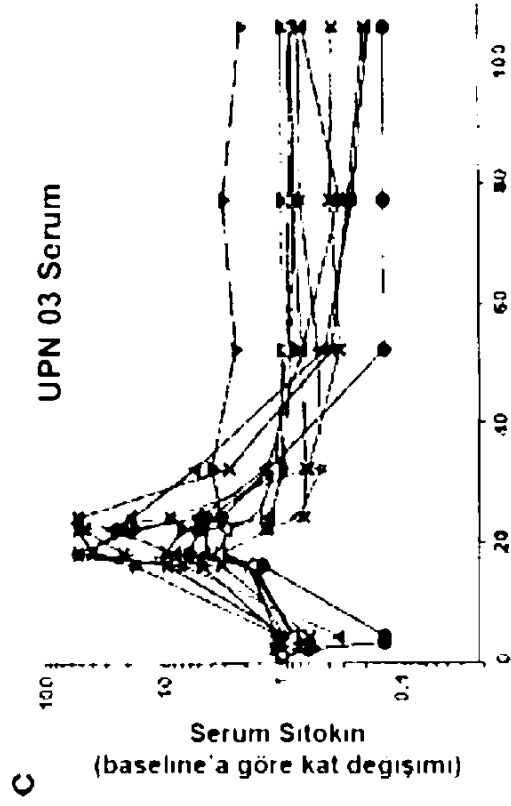
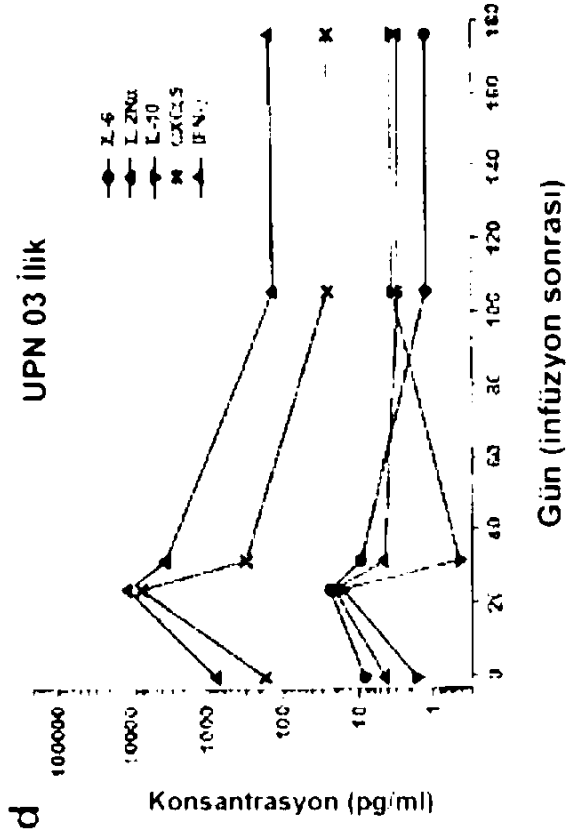
Şekiller 2C-2D



Şekiller 2E-2F

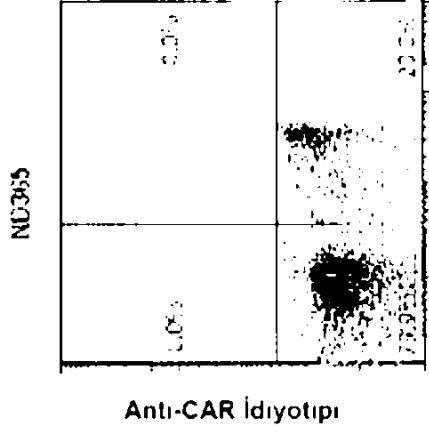
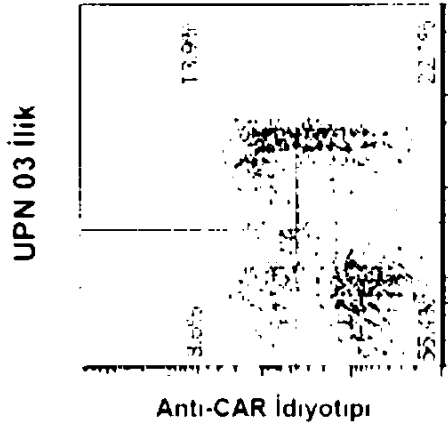
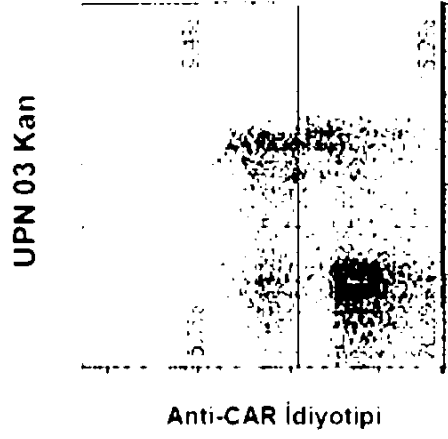


Şekiller 3A-3B

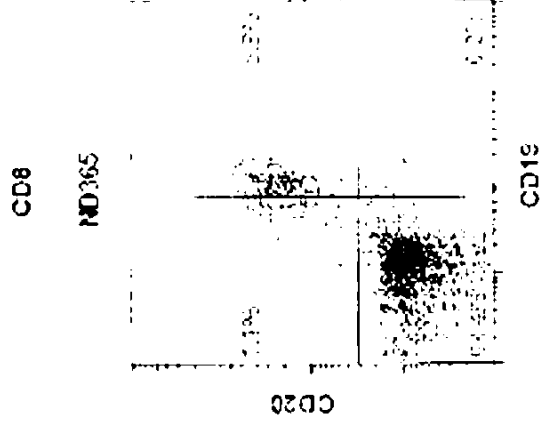
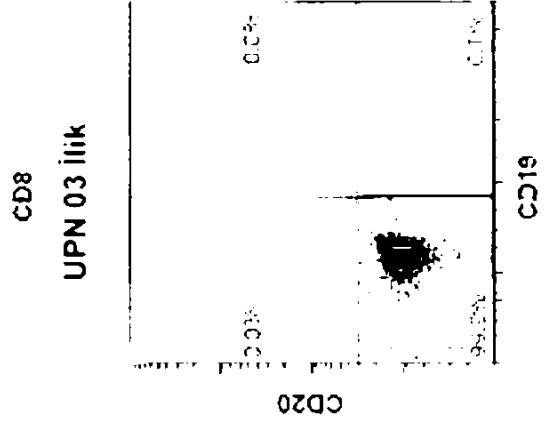
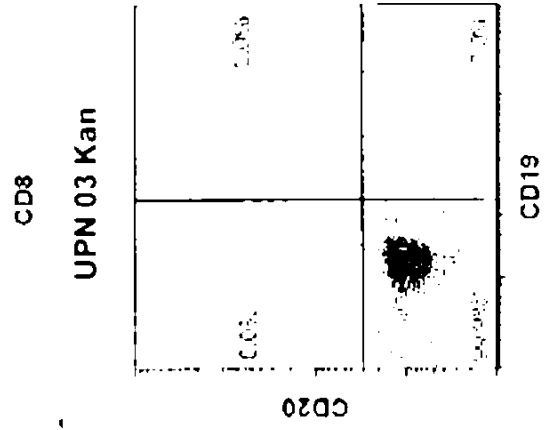


Şekiller 3C-3D

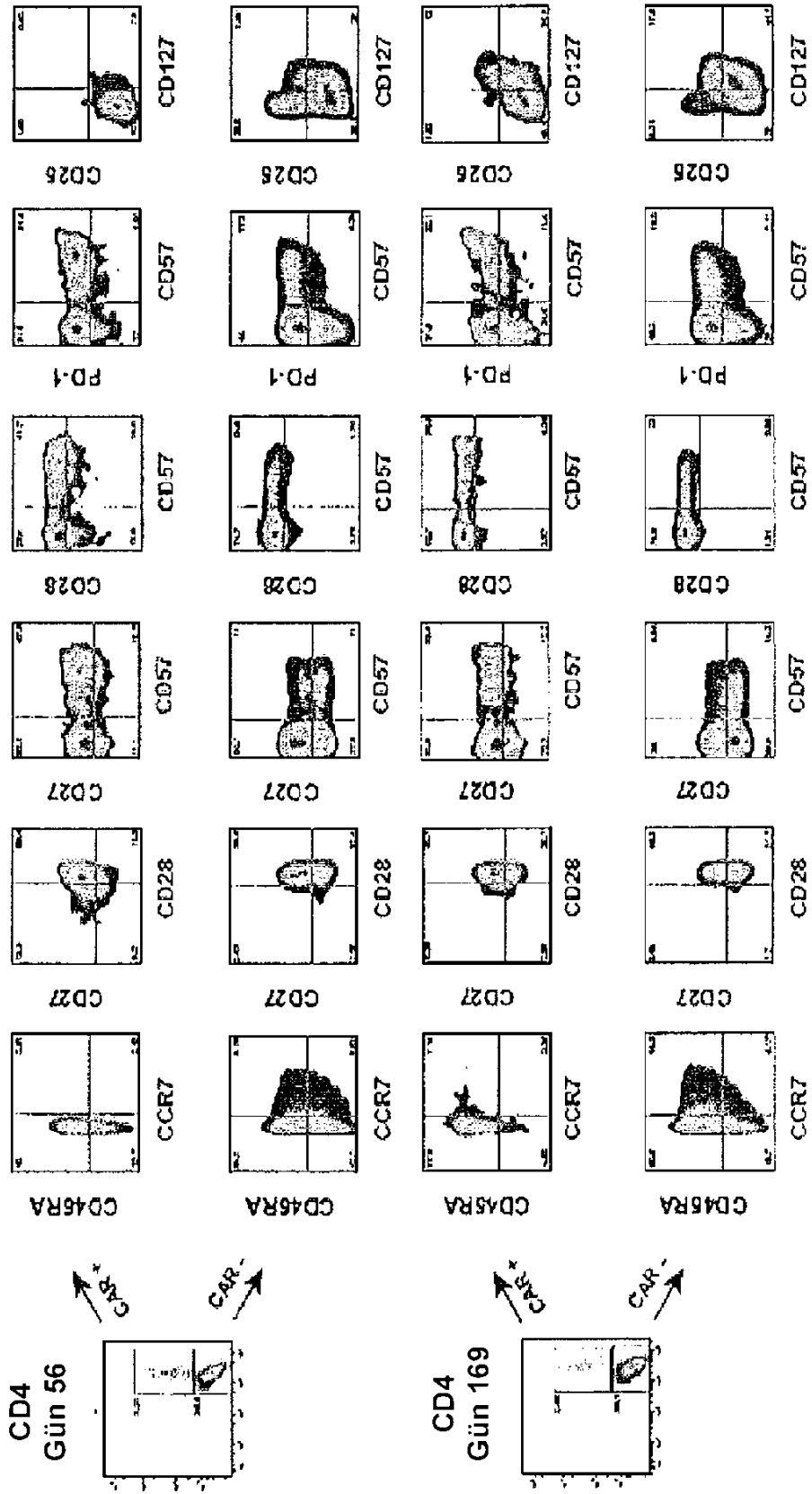
a CD3+
Kapısı



CD3-, CD14 -
Kapısı

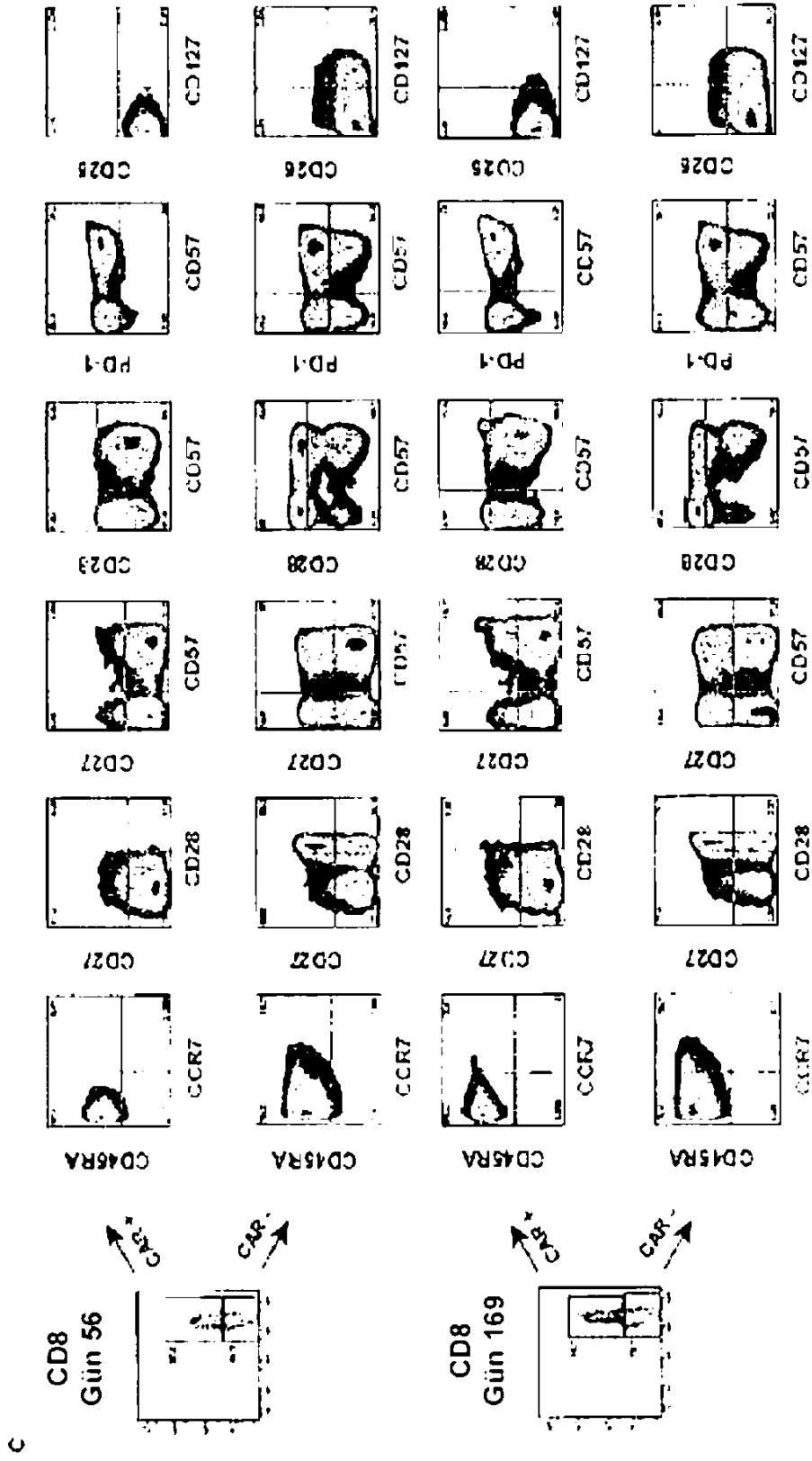


Şekil 4A



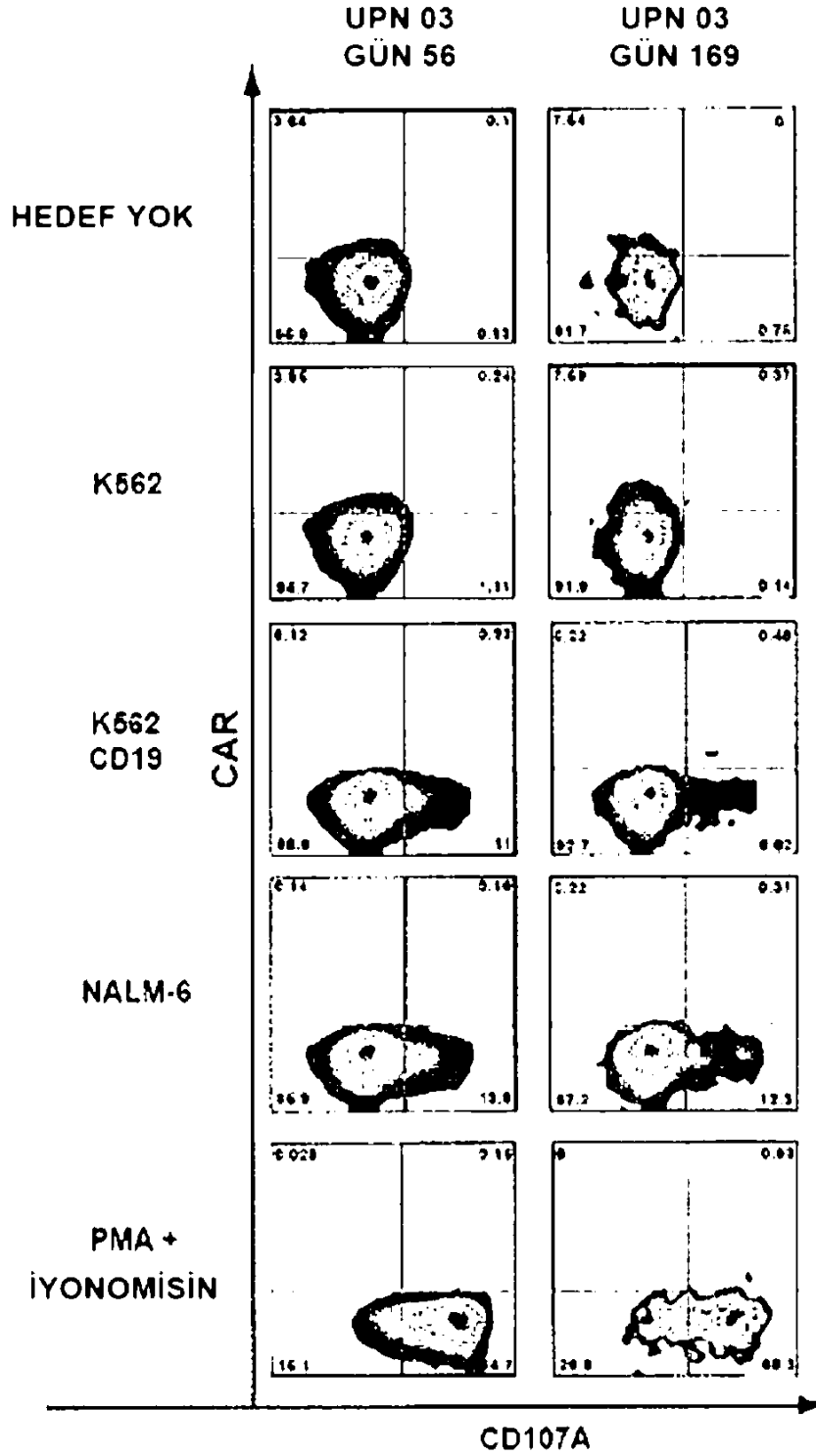
Şekil 4B

b

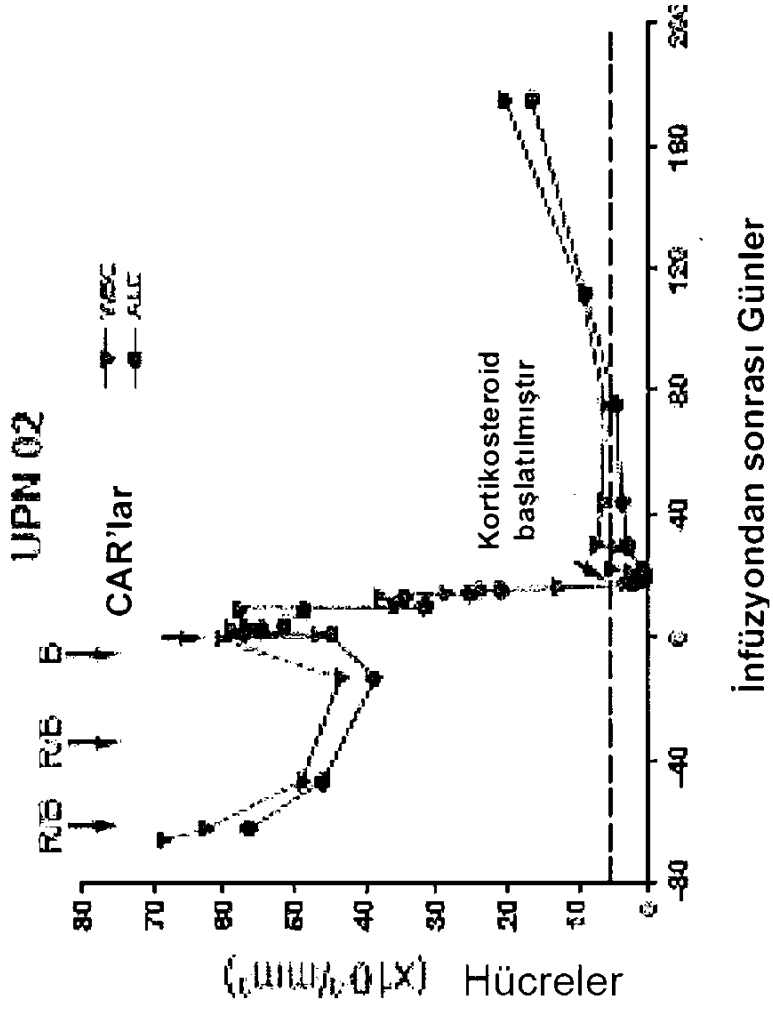


Şekil 4C

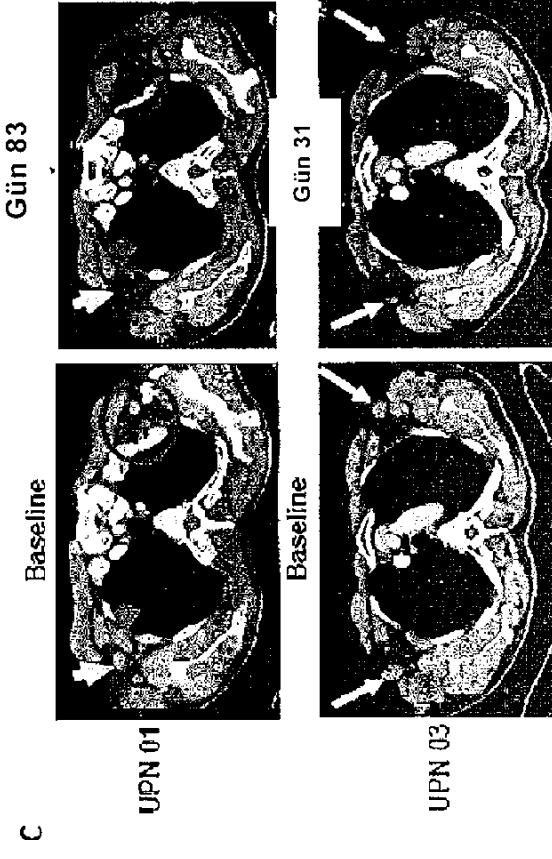
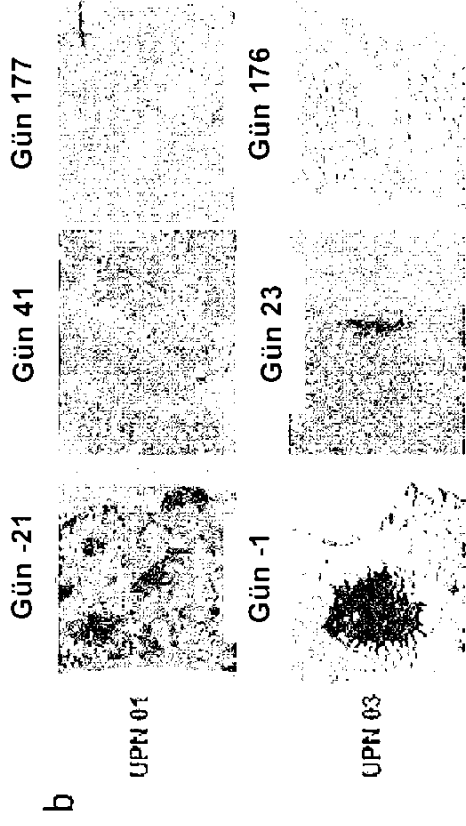
d



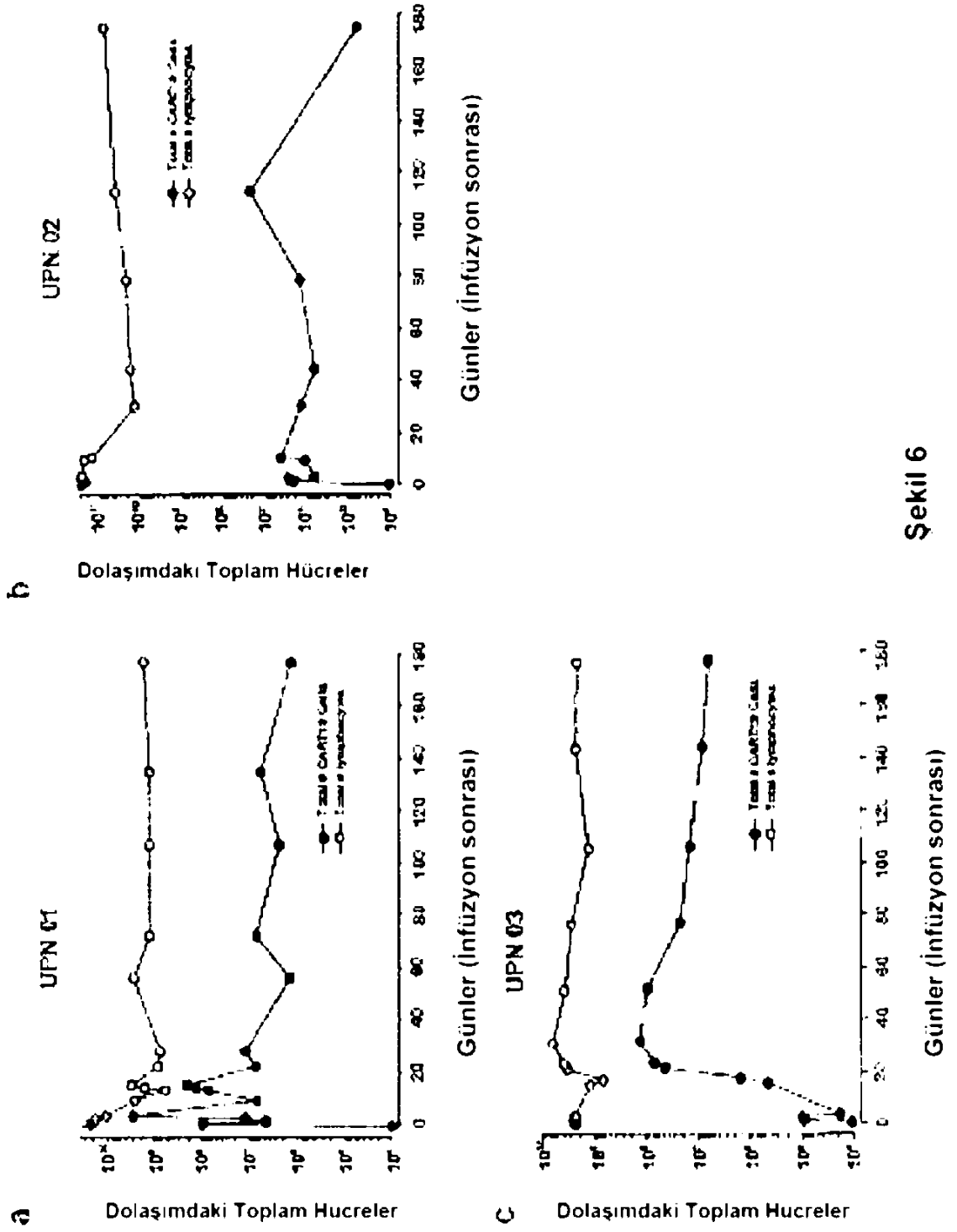
Şekil 4D



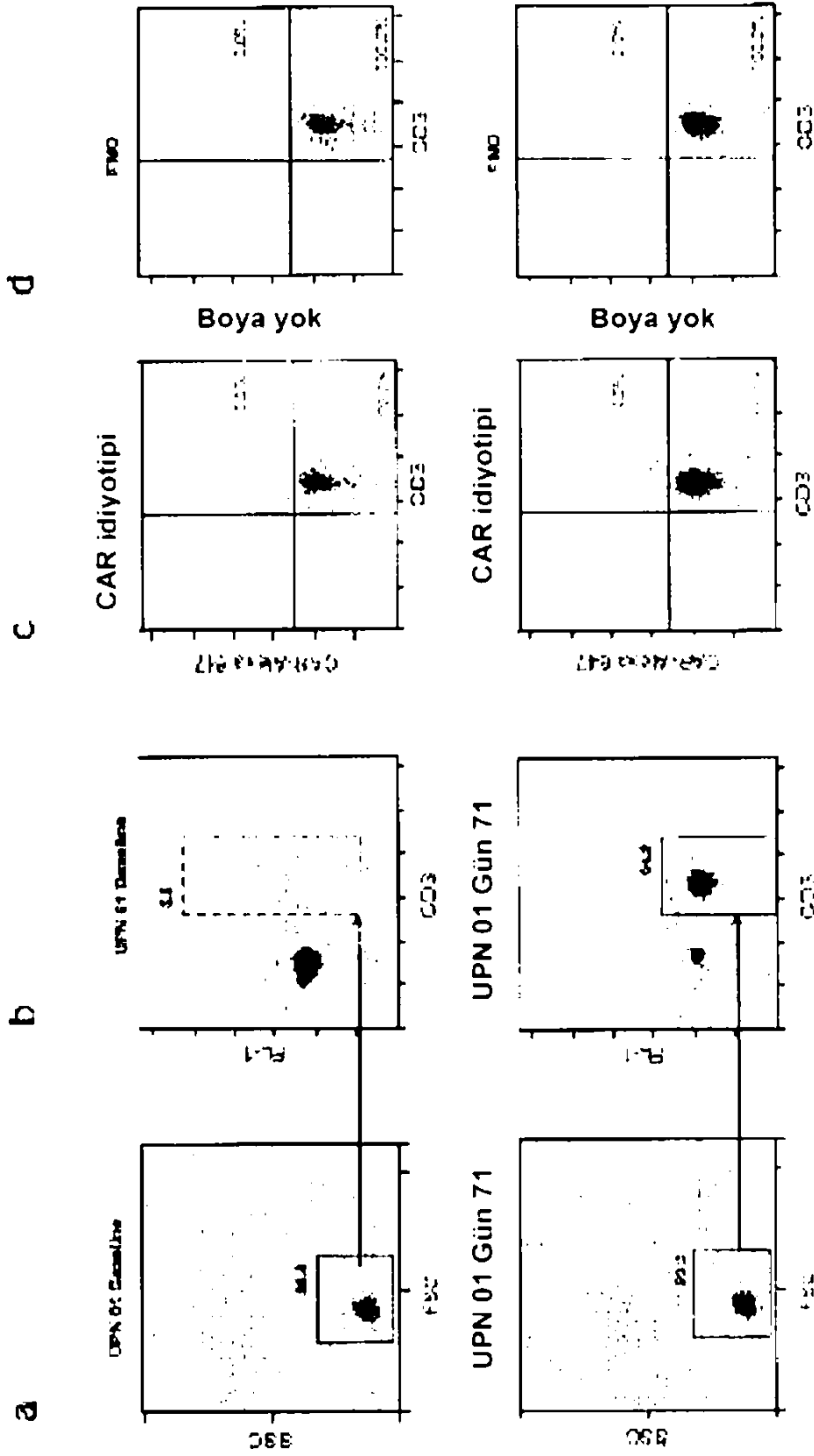
Şekil 5A



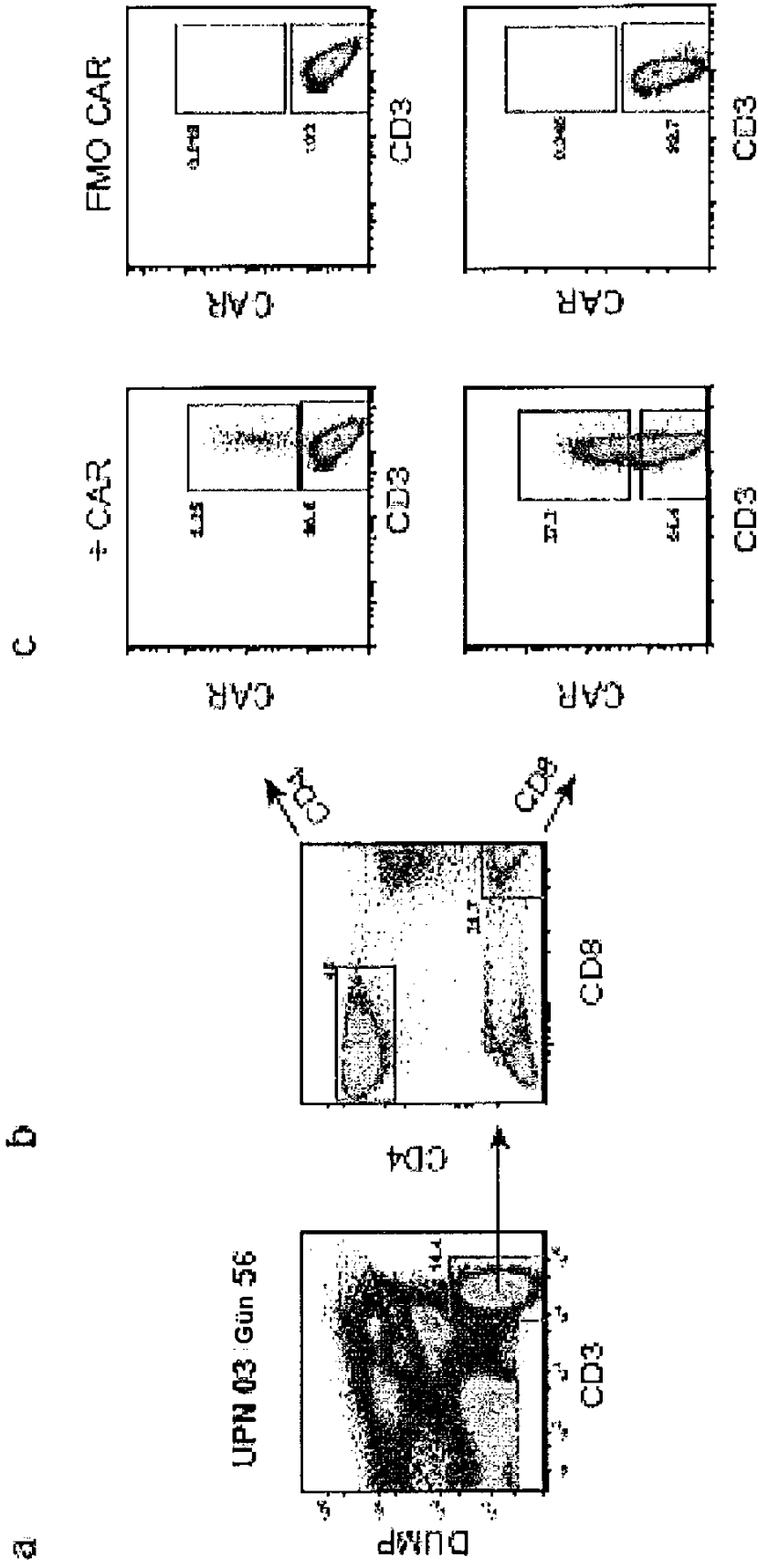
Şekiller 5B-5C



Şekil 6

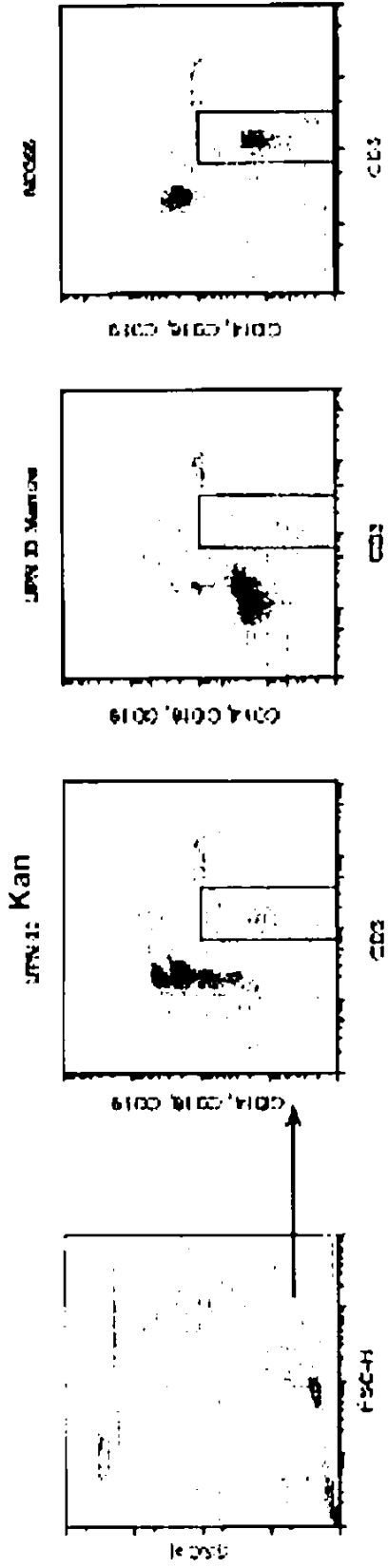


Şekil 7



Şekil 8

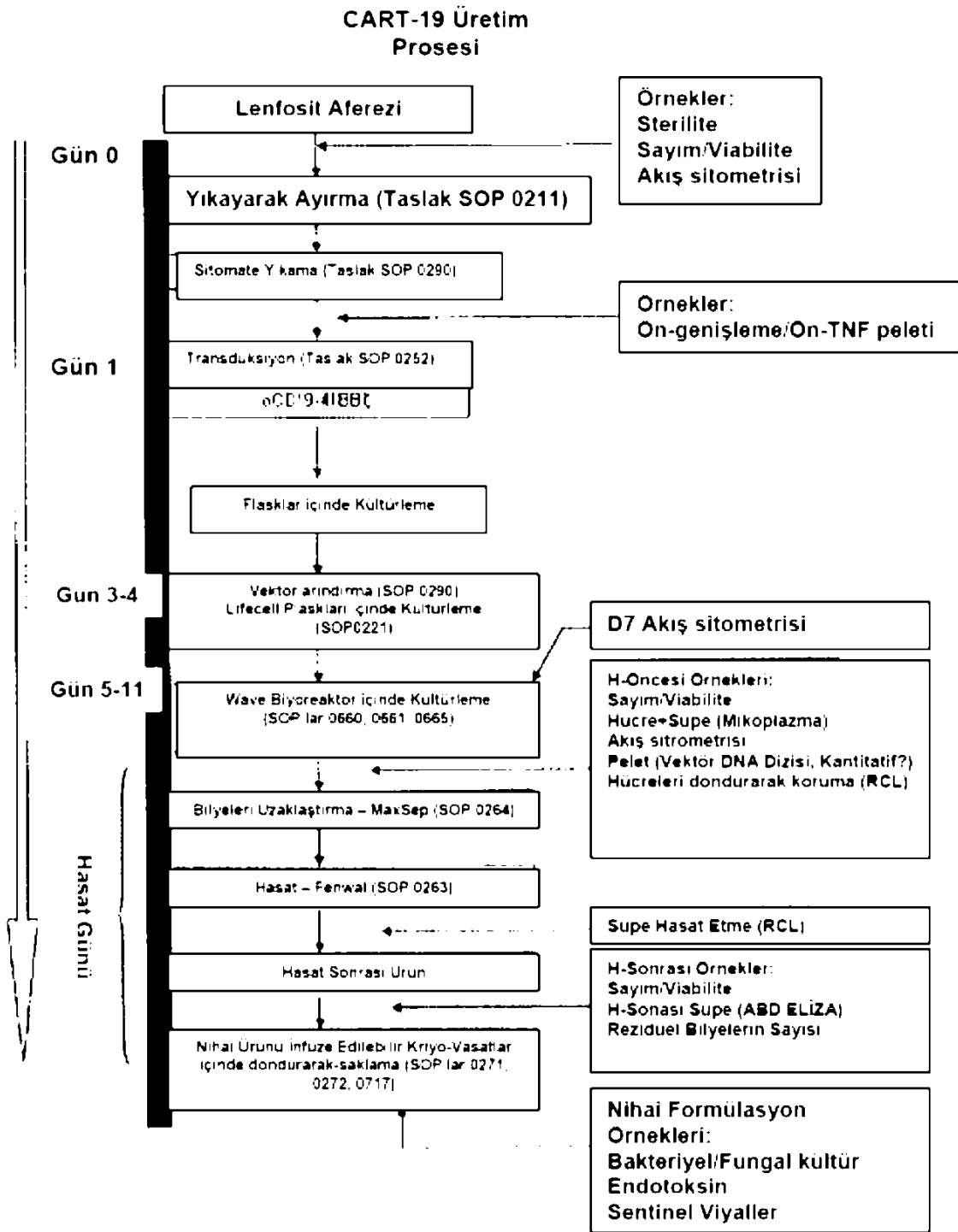
T Hücreleri (CD3+ Kapısı)



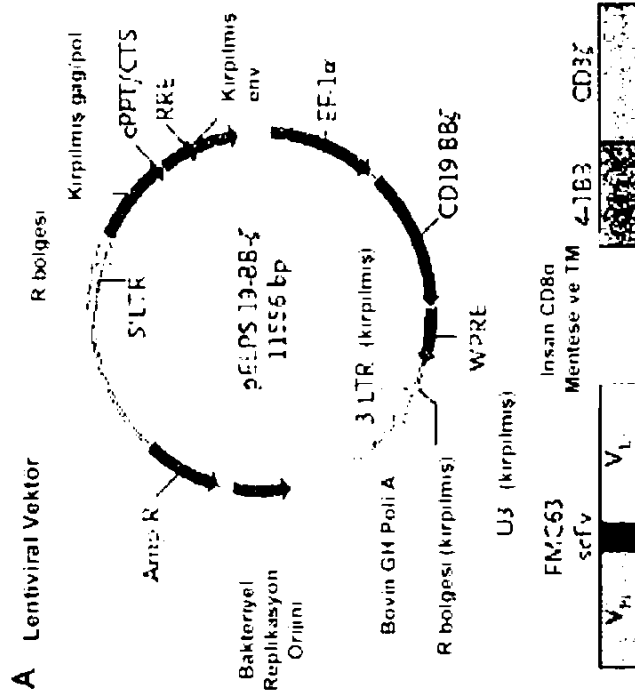
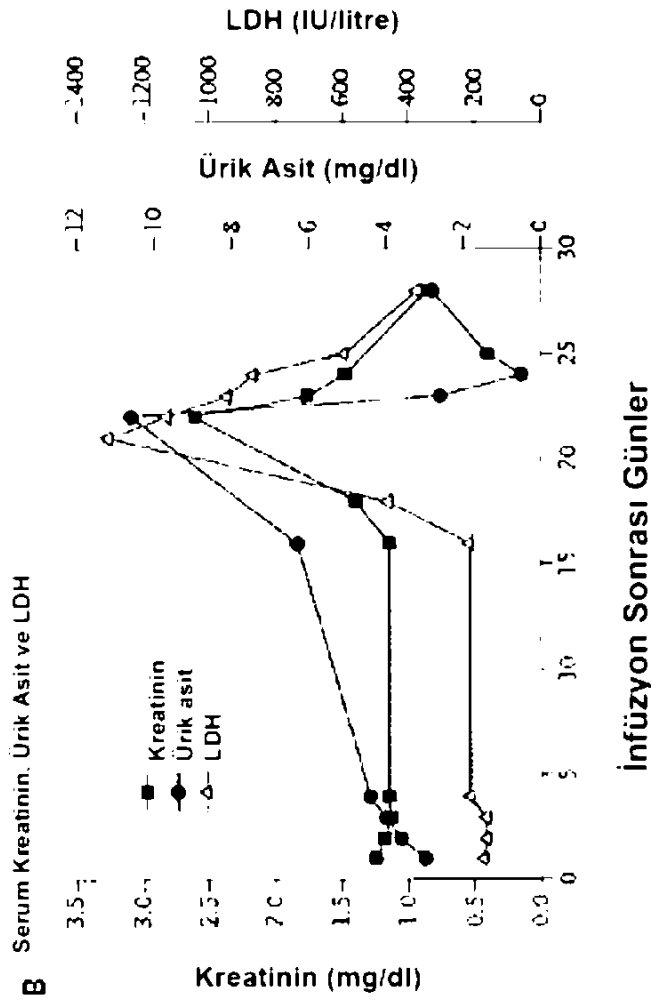
T Hücreleri (CD3-CD14-Kapısı)



Şekil 9



Şekil 11

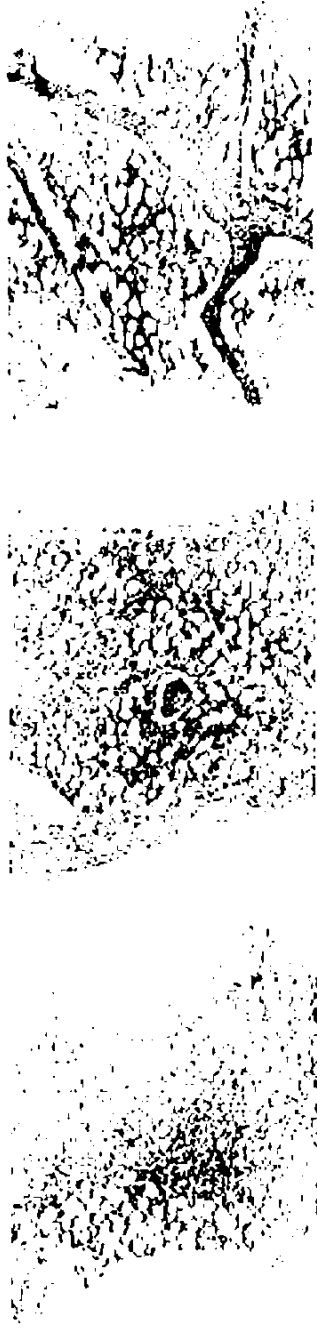


Şekiller 12A-12B

C 90 Kemik İliği-Biyopsisi
Numuneleri Gün -1 (baseline)

6 AY

Gün 23



D Cor Kontrast-Guçlendirilmiş BT

Eksensel

Koronal



Terapiden Önce

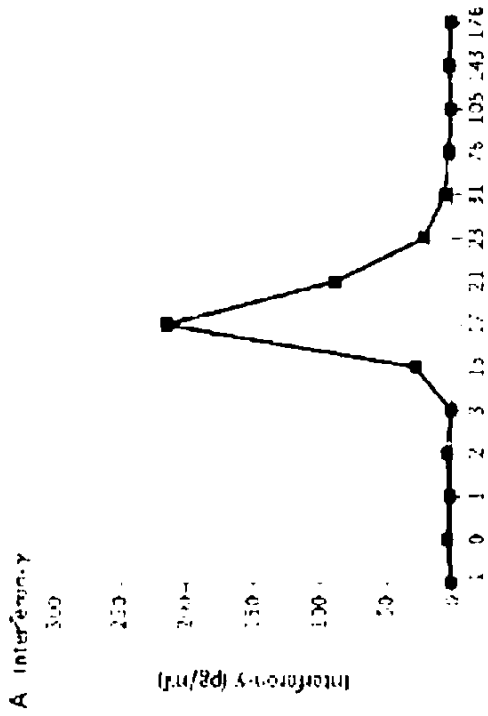
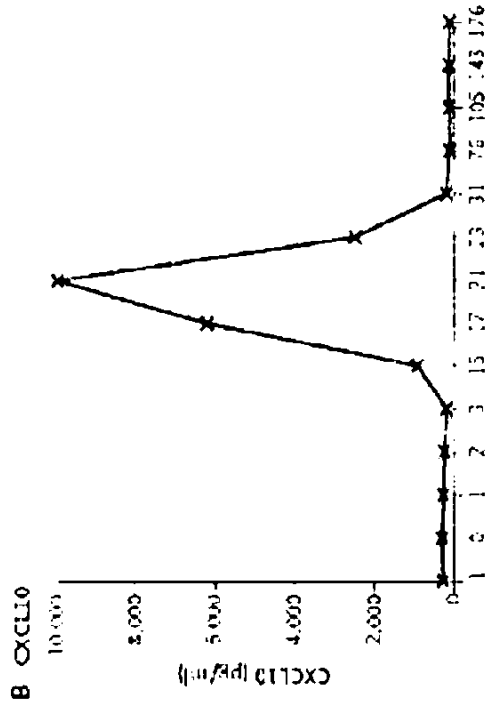


Tedavinin 1 Ayı

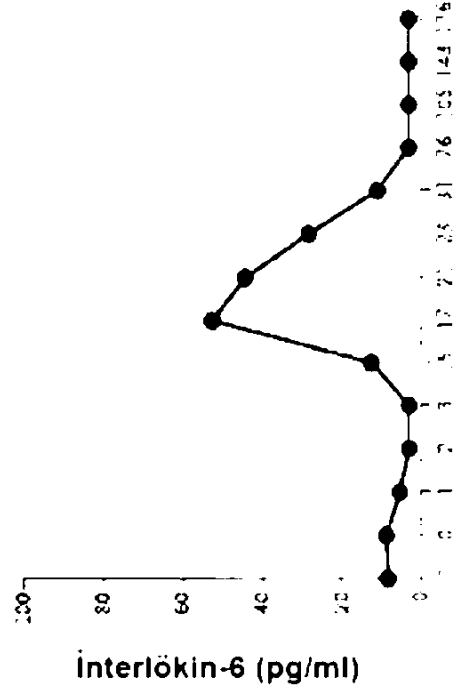


Tedavinin 3 Ayı

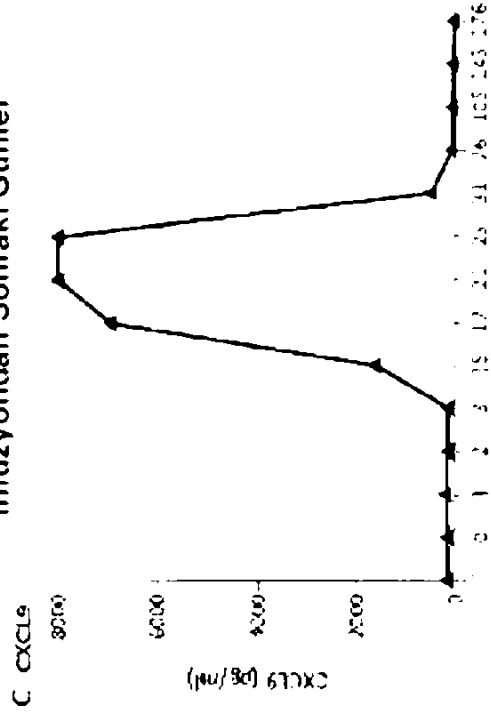
Fi Şekiller 12C-12D



D İnterlökin-6 İnfüzyondan Sonraki Günler

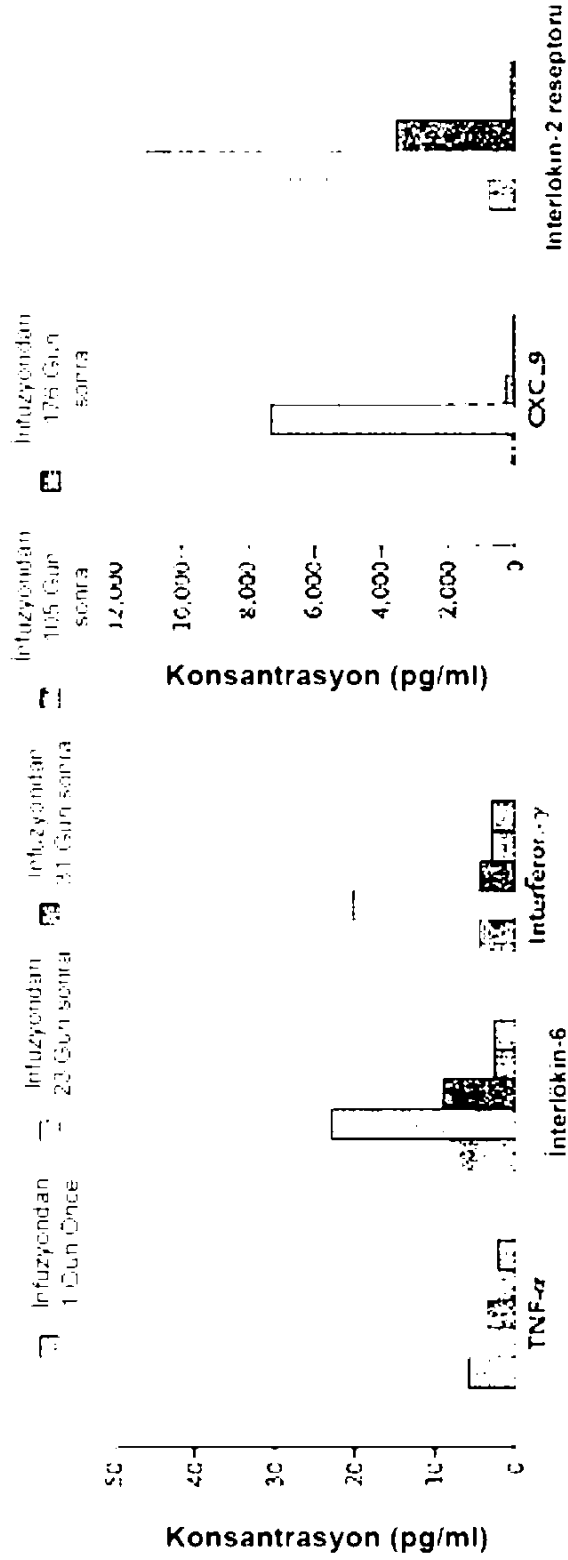


İnfüzyondan Sonraki Günler

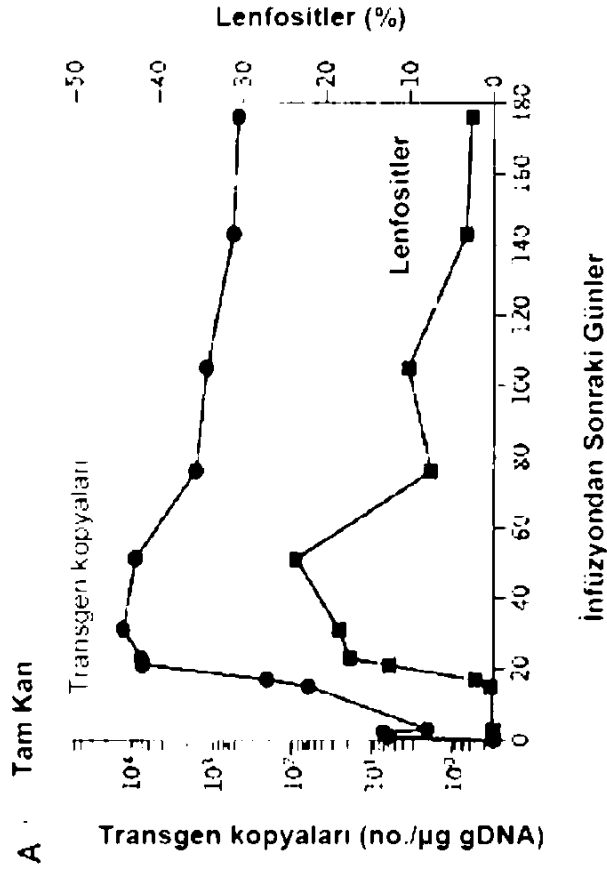
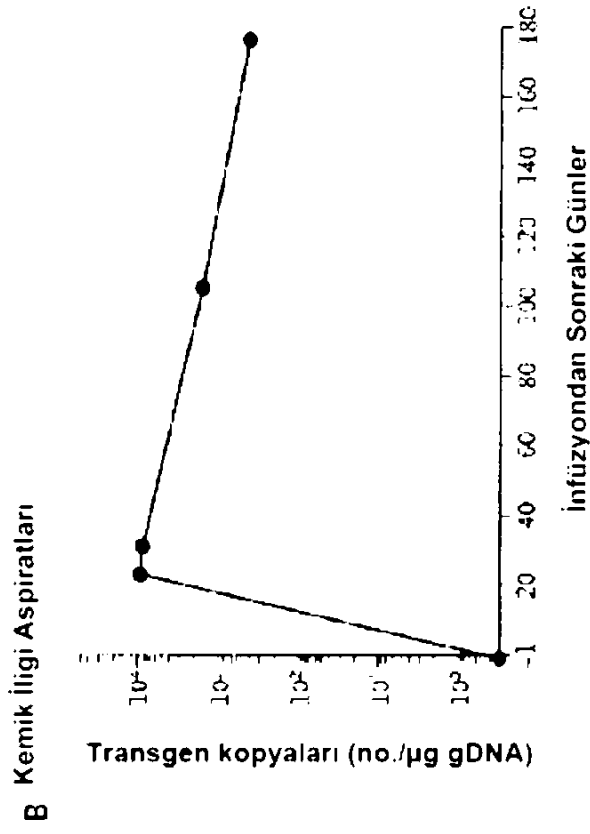


İnfüzyondan Sonraki Günler Şekiller 13A-13D İnfüzyondan Sonraki Günler

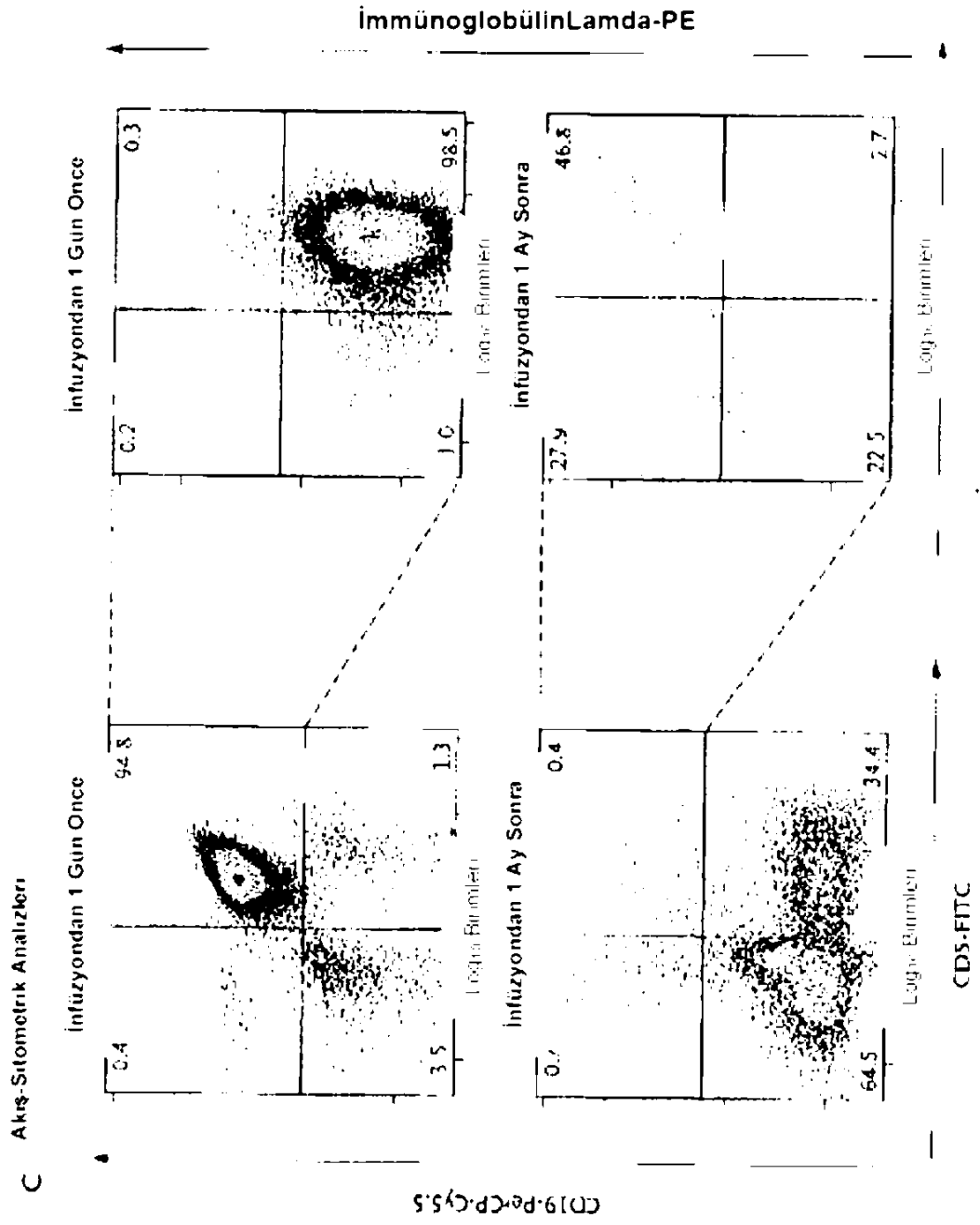
E Kemik iliğindeki İmmün Yanıt



Şekil 13E



Şekiller 14A-14B



İmmüoglobülin Kappa-APC

Şekil 14C