

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044652**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.20

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(21) Номер заявки
202091974

(22) Дата подачи заявки
2019.02.20

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕ ВСМА АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/633,152

(32) 2018.02.21

(33) US

(43) 2020.12.08

(86) PCT/US2019/018698

(87) WO 2019/164891 2019.08.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕЛДЖИН КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
**Аббасиан Махан, Чан Генри,
Харихаран Кандасами, Сунь
Дзеонгхоон, Вермсер Эндрю (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2017223111
WO-A1-2017021450
WO-A1-2012163805
WO-A1-2016166630
WO-A2-2016014565

CARPENTER R O ET AL.: "B-cell Maturation Antigen Is a Promising Target for Adoptive T-cell Therapy of Multiple Myeloma", CLINICAL CANCER RESEARCH, & MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH (AACR) PRECISION MEDICINE SERIES - INTEGRATI; SALT LAKE, UT, USA; JUNE 13 -16, 2015, vol. 19, no. 8, 15 April 2013 (2013-04-15) , pages 2048-2060, XP002727959, ISSN: 1078-0432, DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2422[retrieved on 2013-01-23], the whole document

CARLOS A. RAMOS ET AL.: "CAR-T Cell Therapy for Lymphoma", ANNUAL REVIEW OF MEDICINE : SELECTED TOPICS IN THE CLINICALSCIENCES, vol. 67, no. 1, 14 January 2016 (2016-01-14), pages 165-183, XP055328318, US ISSN: 0066-4219, DOI:10.1146/annurev-med-051914-021702, the whole document

WO-A2-2014089335

US-A1-2016297885

WO-A2-2016094304

(57) Предложены антитела, которые связывают антиген созревания В-клеток (BCMA), а также способы истощения экспрессирующих BCMA клеток у пациента, нуждающегося в этом, включающие в себя введение терапевтически эффективного количества антител или объекта, содержащего их BCMA-связывающий фрагмент. Предложены способы лечения связанных с В-клетками заболеваний, ассоциированных с экспрессией BCMA, у пациента, нуждающегося в этом, включающие в себя введение пациенту терапевтически эффективного количества антител или объекта, содержащего их BCMA-связывающий фрагмент.

B1

044652

044652

B1

1. Список последовательностей

Изобретение содержит список последовательностей, который был подан в электронном виде в ASCII-формате и, таким образом, полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 13 февраля 2019 г., называется 298068-00272_SL.txt и имеет размер 26248 байт.

2. Область техники

Настоящее изобретение относится к выделенным антителам или их фрагментам, которые связываются с антигеном созревания В-клеток (BCMA), к полинуклеотидам, кодирующим антитела или фрагменты, клеткам-хозяевам, продуцирующим антитела или фрагменты, и к способам применения или лечения с использованием антител или фрагментов.

3. Уровень техники

BCMA (антиген созревания В-клеток; также именуемый как TNFRSF17 или CD269) представляет собой трансмембранный белок, принадлежащий к суперсемейству рецепторов TNF. BCMA является маркером В-клеток, который важен для развития и гомеостаза В-клеток благодаря своему взаимодействию со своими лигандами BAFF (фактором активации В-клеток из TNF-семейства; также именуемым TALL-1 или TNFSF13B) и APRIL (индуцирующим пролиферацию лигандом).

Известно, что экспрессия BCMA ограничена клонами В-клеток, и белок в основном присутствует на плазматических клетках и плазмобластах, и в некоторой степени на В-клетках памяти, но практически отсутствует на периферических и наивных В-клетках. Вместе с членами своего семейства, белком TACI (трансмембранным активатором и взаимодействующим с циклофилиновым лигандом) и BAFF-R (Рецептором фактора активации В-клеток из семейства TNF), BCMA регулирует различные аспекты гуморального иммунитета, развития В-клеток и гомеостаза.

BCMA также экспрессируется на клетках множественной миеломы (ММ). BCMA, по-видимому, поддерживает рост и выживание клеток множественной миеломы (ММ). Клеточные линии ММ и свежее выделенные клетки ММ обычно экспрессируют белки BCMA и TACI на своей клеточной поверхности и имеют вариабельную экспрессию белка BAFF-R на своей клеточной поверхности. Множественная миелома - вторая по частоте гематологическая злокачественная опухоль, составляющая 2% всех случаев смерти от рака. ММ является гетерогенным заболеванием и вызывается в основном хромосомными транслокациями, включая t(11;14), t(4;14), t(8;14), del(13) и del(17). Пациенты с ММ могут иметь множество связанных с заболеванием симптомов из-за инфильтрации костного мозга, разрушения костей, почечной недостаточности, иммунодефицита и психологического бремени, связанного с онкологическим диагнозом.

Современные методы лечения, применяемые для лечения множественной миеломы, обычно не позволяют достичь излечения пациента. Трансплантация стволовых клеток может не подходить для многих пациентов из-за преклонного возраста, наличия других серьезных заболеваний или других физических ограничений. Химиотерапия лишь частично контролирует множественную миелому и редко приводит к полной ремиссии. Таким образом, существует потребность в новых, инновационных методах лечения множественной миеломы и других заболеваний или расстройств, связанных с плазматическими или В-клетками.

4. Сущность изобретения

В первом аспекте в настоящем документе предложено антитело, которое связывается с Антигеном созревания В-клеток (BCMA), или его BCMA-связывающий фрагмент, содержащий последовательности CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, соответственно; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, соответственно; SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно; SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно; SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно; SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31, соответственно; SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно; SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37, соответственно; SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно; SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 45, соответственно; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, соответственно; SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53, соответственно; SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56, соответственно; или SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно. В конкретном варианте осуществления антитело дополнительно содержит последовательности CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, соответственно. В другом конкретном варианте осуществления антитело дополнительно содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно.

В конкретном варианте осуществления в настоящем документе предложено антитело, которое связывается с BCMA, или его BCMA-связывающий фрагмент, содержащий легкую цепь, содержащую последовательности CDR1, CDR2 или CDR3 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, соответственно; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; или SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, соответственно.

фрагментов антитело или его ВСМА-связывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 7-9, 10-12 или 13-15 и являются по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентичными SEQ ID NO: 6; антитело или его ВСМА-связывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 18-20, 21-23 или 24-26 и являются по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99%, идентичными SEQ ID NO: 17; антитело или его ВСМА-связывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 29-31, 32-34 или 35-37 и являются по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90 по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентичными SEQ ID NO: 28; антитело или его ВСМА-связывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 40-42, 43-45 или 46-48 и являются по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентичными SEQ ID NO: 39; антитело или его ВСМА-связывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 51-53, 54-56 или 57-59 и являются по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентичными SEQ ID NO: 50.

В конкретных вариантах осуществления любого из антител против ВСМА или их ВСМА-связывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе, антитело представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, диантитело, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент, Fv, биспецифичное антитело, биспецифичный Fab₂, биспецифичный (mab)₂, гуманизированное антитело, искусственно созданное человеческое антитело, биспецифичный активатор Т-клеток, биспецифичный активатор НК-клеток, одноцепочечное антитело (например, одноцепочечный Fv-фрагмент или scFv), Triomab, вариант IgG "выступ и впадина" (kih) с общей легкой цепью, антитела на платформе CrossMAb, орто-Fab IgG, DVD-Ig, 2 в 1-IgG, IgG-scFv, sdFv2-Fc, би-нанотело, TandAb, антитело на платформе с перепрограммируемой направленностью и двойной аффинностью (DART-платформе), DART-Fc, scFv-HSA-scFv (где HSA представляет собой сывороточный альбумин человека) или антитело с "запирающим связыванием" (dock-and-lock) (DNL)-Fab3. В другом конкретном варианте осуществления любого из антител против ВСМА или их ВСМА-связывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе, указанное антитело или фрагмент представляет собой конъюгат антитела с лекарственным средством.

В другом аспекте в настоящем документе предложен полипептид, который содержит последовательности CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, соответственно; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, соответственно; SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно; SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно; SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно; SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31, соответственно; SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно; SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37, соответственно; SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно; SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 45, соответственно; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, соответственно; SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53, соответственно; SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56, соответственно; или SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно. В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен полипептид, который содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно. В конкретном варианте осуществления любого из полипептидов, предложенных в настоящем документе, полипептид дополнительно содержит последовательности CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, соответственно. В конкретном варианте осуществления любого из полипептидов, предложенных в настоящем документе, полипептид дополнительно содержит последовательности CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно. Кроме того, в настоящем документе предложен полипептид, который содержит переменную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 1. Кроме того, в настоящем документе предложен полипептид, который содержит переменную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 50.

В другом аспекте в настоящем документе предложена композиция, содержащая любое из антител, их связывающих фрагментов или полипептидов, предложенных в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию. В других конкретных вариантах осуществления композиция составлена для внутривенной, внутриартериальной, внутримышечной, внутрикожной, подкожной, интрадуральной, интратекальной или внутрибрюшинной доставки.

В другом аспекте в настоящем документе предложены полинуклеотиды, кодирующие любые из ан-

тител, фрагментов антител или полипептидов, предложенных в настоящем документе. В одном варианте осуществления в настоящем документе предложен полинуклеотид, кодирующий антитело против ВСМА, ВСМА-связывающий фрагмент антитела или полипептид, содержащие последовательности CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, соответственно; SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, соответственно; SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно; SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно; SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно; SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31, соответственно; SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно; SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37, соответственно; SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно; SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 45, соответственно; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, соответственно; SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53, соответственно; SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56, соответственно; или SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно. В более конкретном варианте осуществления любого из полинуклеотидов, предложенных в данном документе, полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 60. В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен полинуклеотид, кодирующий антитело против ВСМА, фрагмент связывающего ВСМА антитела или полипептид, содержащие последовательности CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно. В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен полинуклеотид, который кодирует антитело против ВСМА, ВСМА-связывающий фрагмент антитела или полипептид, содержащие вариательную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен полинуклеотид, который кодирует антитело против ВСМА, ВСМА-связывающий фрагмент антитела или полипептид, содержащие вариательную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 1 и вариательную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 50. В конкретном варианте осуществления в настоящем документе предложен полинуклеотид, который кодирует антитело против ВСМА, ВСМА-связывающий фрагмент антитела или полипептид, содержащие вариательную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 1 и вариательную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 50.

В другом аспекте в настоящем документе предложены полинуклеотидные векторы, содержащие полинуклеотиды, предложенные в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления вектор представляет собой экспрессионный вектор. В другом конкретном варианте осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор или лентивирусный вектор.

В другом аспекте в настоящем документе предложена клетка, содержащая любой из полинуклеотидов, предложенных в настоящем документе, или экспрессирующая любое из антител против ВСМА, их ВСМА-связывающие фрагменты или полипептиды, предложенные в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления клетка содержит любой из векторов, предложенных в данном документе.

В другом аспекте в настоящем документе предложен способ получения полипептида, включающий в себя инициацию в любой из клеток, предложенных в настоящем документе, экспрессии полинуклеотида, предложенного в настоящем документе, вследствие которой продуцируется указанный полипептид; и выделение указанного полипептида. Кроме того, в настоящем документе предложен способ получения антитела против ВСМА или его ВСМА-связывающего фрагмента, включающий в себя инициацию в любой из клеток, предложенных в настоящем документе, экспрессии полинуклеотида, предложенного в настоящем документе, вследствие которой продуцируется указанное антитело или его фрагмент; и выделение указанного антитела или его фрагмента.

В другом аспекте, в настоящем документе предложен способ истощения экспрессирующих ВСМА клеток у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества любого из антител против ВСМА, их ВСМА-связывающего фрагмента или полипептидов, предложенных в данном документе. Кроме того, в настоящем документе предложен способ истощения экспрессирующих ВСМА клеток у пациента, нуждающегося в этом, включающий в себя введение пациенту терапевтически эффективного количества любого из антител против ВСМА, их ВСМА-связывающего фрагмента или полипептидов, предложенных в настоящем документе. Кроме того, в настоящем документе предложен способ лечения заболевания, вызванного экспрессирующими ВСМА клетками, например экспрессирующими ВСМА плазматическими клетками, у пациента, нуждающегося в этом, включающий в себя введение пациенту терапевтически эффективного количества антител против ВСМА, их ВСМА-связывающего фрагмента или полипептидов, предложенных в настоящем документе. Кроме того, в настоящем документе предложен способ лечения связанного с В-клетками заболевания, ассоциированного с экспрессией ВСМА, у пациента, нуждающегося в этом, включающий в себя введение пациенту терапевтически эффективного количества любого из антител против ВСМА, их ВСМА-связывающего фрагмента или полипептидов, предложенных в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления изобретения связанное с В-клетками заболевание представляет собой множественную миелому, плазмцитому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, фолликулярную лим-

фому, мелкоклеточную лимфому с нерасщепленным ядром, эндемическую лимфому Беркитта, спорадическую лимфому Беркитта, лимфому маргинальной зоны, экстра-нодальную лимфому лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками, узловую моноцитотидную В-клеточную лимфому, лимфому селезенки, лимфому клеток мантийной зоны, крупноклеточную лимфому, диффузную лимфому из смешанных клеток, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), индолентную лимфому, лимфоплазматическую В-клеточную лимфому, иммунобластную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, легочную В-клеточную ангиоцентрическую лимфому, малую лимфоцитарную лимфому, хронический лимфоцитарный лейкоз, пролиферацию В-клеток с неопределенным злокачественным потенциалом, лимфоматозный гранулематоз, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, иммунорегуляторное заболевание, ревматоидный артрит, миастению, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, антифосфолипидный синдром, болезнь Шагаса, болезнь Грейвса, гранулематоз Вегенера, узелковый полиартериит, синдром Шегрена, вульгарную пузырчатку, склеродермию, рассеянный склероз, антифосфолипидный синдром, ANCA-ассоциированный васкулит, болезнь Гудпасчера, болезнь Кавасаки, аутоиммунную гемолитическую анемию, системную красную волчанку, быстро прогрессирующий гломерулонефрит, болезнь тяжелых цепей, первичный или иммуноцит-ассоциированный амилоидоз, кожную красную волчанку, моноклональную гаммопатию неустоановленного значения или глиобластому.

В дополнительном аспекте в настоящем документе предложены химерные антигенные рецепторы (CAR), которые содержат любую из последовательностей CDR тяжелой или легкой цепи, предложенных в настоящем документе, или любую из переменных последовательностей тяжелой или легкой цепи, предложенных в настоящем документе. В одном варианте осуществления CAR содержит указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и/или указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи во внеклеточном ВСМА-связывающем домене. В другом варианте осуществления CAR содержит указанную последовательность легкой цепи и/или указанную последовательность тяжелой цепи во внеклеточном ВСМА-связывающем домене. В другом варианте осуществления CAR содержит или дополнительно содержит один или несколько из: трансмембранного домена, первичного сигнального домена и/или костимулирующего домена. В данном документе также предложены клетки, например иммунные клетки, которые экспрессируют любой из CAR, предложенных в настоящем документе. В более конкретных вариантах осуществления клетки представляют собой Т-клетки, естественные киллерные клетки (NK-клетки) или естественные киллерные Т-клетки (NKT-клетки). Кроме того, в настоящем документе предложен способ истощения клеток, экспрессирующих ВСМА, например плазматических клеток, у пациента, нуждающегося в этом, включающий в себя введение пациенту терапевтически эффективного количества клеток, экспрессирующих анти-ВСМА CAR, предложенный в настоящем документе. Способ лечения связанного с В-клетками заболевания, ассоциированного с экспрессией ВСМА, у пациента, нуждающегося в этом, включающий в себя введение пациенту терапевтически эффективного количества клеток по любому из вариантов осуществления, представленных в настоящем описании. В конкретном варианте осуществления любого из способов, включающих клетку, экспрессирующую анти-ВСМА CAR, предложенную в настоящем документе, связанное с В-клетками заболевание, представляет собой множественную миелому, плазмоцитому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, фолликулярную лимфому, мелкоклеточную лимфому с нерасщепленным ядром, эндемическую лимфому Беркитта, спорадическую лимфому Беркитта, лимфому маргинальной зоны, экстра-нодальную лимфому лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками, узловую моноцитотидную В-клеточную лимфому, лимфому селезенки, лимфому клеток мантийной зоны, крупноклеточную лимфому, диффузную лимфому из смешанных клеток, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), индолентную лимфому, лимфоплазматическую В-клеточную лимфому, иммунобластную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, легочную В-клеточную ангиоцентрическую лимфому, малую лимфоцитарную лимфому, хронический лимфоцитарный лейкоз, пролиферацию В-клеток с неопределенным злокачественным потенциалом, лимфоматозный гранулематоз, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, иммунорегуляторное заболевание, ревматоидный артрит, миастению, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, антифосфолипидный синдром, болезнь Шагаса, болезнь Грейвса, гранулематоз Вегенера, узелковый полиартериит, синдром Шегрена, вульгарную пузырчатку, склеродермию, рассеянный склероз, антифосфолипидный синдром, ANCA-ассоциированный васкулит, болезнь Гудпасчера, болезнь Кавасаки, аутоиммунную гемолитическую анемию, системную красную волчанку, быстро прогрессирующий гломерулонефрит, болезнь тяжелых цепей, первичный или иммуноцит-ассоциированный амилоидоз, кожную красную волчанку, моноклональную гаммопатию неустоановленного значения или глиобластому.

5. Фигуры

Фиг. 1 представляет собой схематическую иллюстрацию avidного (1A) и неavidного (1B) связываний.

На фиг. 2 представлены гистограммы, показывающие, что IgG человека, 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199, связывают клетки С6, экспрессирующие ВСМА человека.

На фиг. 3 представлены гистограммы, демонстрирующие, что IgG человека, 320262, 319966,

320111, 319883 и 320199, не связывают клетки Нек293, экспрессирующие представителя семейства TNF-рецепторов, TNFRSF12A.

На фиг. 4 представлены гистограммы, подтверждающие, что IgG человека, 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199 связывают клетки множественной миеломы человека NCIN929, которые эндогенно экспрессируют ВСМА.

На фиг. 5 представлены кривые доза-ответ для связывания IgG человека, 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199, с ВСМА-положительными клетками множественной миеломы человека U266B1 и KMS12BM. На фиг. 5 также представлены гистограммы, изображающие профили экспрессии представителей семейства TNF-рецепторов, ВСМА, TAC1 и BAFF, в клетках OPM2 и NUDHL1 с использованием коммерчески доступных антител. Наконец, на фигуре показаны кривые доза-ответ для связывания антител 320111 и 320262 с клетками OPM2 (BCMA⁺/TAC1/BAFF⁺), но не с клетками NUDHL1 (BCMA⁻/TAC1⁻/BAFF⁻).

6. Подробное описание

В настоящем документе предложены полипептиды, например, ВСМА-связывающие полипептиды, которые содержат специфичные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и ВСМА-связывающие антитела, фрагменты антител и полипептиды, которые содержат такие последовательности CDR1, CDR2 и CDR3. В настоящем документе также предложены способы применения таких антител, фрагментов антител и полипептидов для терапевтических целей, например, для лечения субъектов, страдающих заболеванием или расстройством, связанным с плазматическими или В-клетками.

В контексте настоящего описания "CDR" означает определяющую комплементарность область, которая представляет собой определенные последовательности тяжелой или легкой цепей антитела, опосредующие связывание между антителом и антигеном или эпитопом, на который направлено антитело; аминокислотные остатки антитела, которые (обычно три или четыре короткие области с крайней изменчивостью последовательности) находятся в домене V-области иммуноглобулина, которые образуют антигенсвязывающий сайт и являются основными детерминантами антигенной специфичности. Последовательность CDR может быть определена или пронумерована, например, по системе Кабата (см. Kabat, et al., 1983. *Sequence of Proteins of Immunological Interest*. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland); по системе Чотии

(см. Chothia & Lesk, "Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins," *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)); или по системе IMGT (см. Lefranc *et al.*, "IMGT Unique Numbering for Immunoglobulin and Cell Receptor Variable Domains and Ig superfamily V-like domains," *Dev. Comp. Immunol.* 27, 55-77 (2003)). См. также Abhinandan & Martin, "Analysis and Improvements to Kabat and Structurally Correct Numbering of Antibody Variable Domains," *Mol. Immunol.* 45:3832 (2008).

6.1. Полипептиды.

В настоящем документе предложен полипептид, который содержит специфичные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи. В конкретных вариантах осуществления изобретения такие полипептиды способны связывать ВСМА либо по отдельности, либо в комбинации с полипептидом, содержащим специфичные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи.

В первом варианте осуществления в настоящем документе предложен полипептид, который содержит последовательности CDR1, CDR2 и/или CDR3 SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно. Кроме того, в настоящем документе предложен полипептид, который содержит последовательности CDR1, CDR2 и/или CDR3 SEQ ID NO: 10, 11 и 12, соответственно. Кроме того, в настоящем документе предложен полипептид, который содержит последовательности CDR1, CDR2 и/или CDR3 с SEQ ID NO: 13, 14 и 15, соответственно. В конкретном варианте осуществления любого из этих вариантов осуществления полипептид содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 2. В конкретном варианте осуществления любого из этих вариантов осуществления полипептид представляет собой Fab-фрагмент, который содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 6. В другом конкретном варианте осуществления любого из этих вариантов осуществления, полипептид представляет собой F(ab')₂-фрагмент, который содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 6.

В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен полипептид, который содержит последовательности CDR1, CDR2 и/или CDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно. Кроме того, в настоящем документе предложен полипептид, который содержит последовательности CDR1, CDR2 и/или CDR3 с SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно. В настоящем документе дополнительно предложен полипептид, который содержит последовательности CDR1, CDR2 и/или CDR3 SEQ ID NO: 24, 25 и 26, соответственно. В конкретном варианте любого из этих вариантов осуществления полипептид содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 17. В конкретном варианте осуществления любого из этих вариантов осуществления полипептид представляет собой Fab-фрагмент, который содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 17. В другом

меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентичными SEQ ID NO: 39; антитело или его ВСМА-связывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 51-53, 54-56 или 57-59 и являются по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентичными SEQ ID NO: 50.

6.2. Антитела.

В настоящем документе также предложены антитела, которые представляют собой или содержат последовательности CDR или вариабельные последовательности тяжелой или легкой цепей.

Термин "антитело", используемый в данном документе, означает любую природную или искусственно созданную конфигурацию антигенсвязывающего полипептида, включающую одну, две или три CDR легкой цепи и одну, две или три CDR тяжелой цепи, где полипептид способен связываться с антигеном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело по изобретению представляет собой антитело с Fc-частью или без Fc-части. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела, предложенные в настоящем документе, представляют собой антитела IgG, например антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела представляют собой антитела IgA, антитела IgE, антитела IgD или антитела IgM. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела представляют собой моноклональные антитела, например, моноклональные антитела IgG.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, любое из предложенных в настоящем документе антител содержит вариант Fc для Fc-области человеческого IgG дикого типа, где указанное антитело имеет пониженную аффинность к FcγRIIIA и/или FcγRIIA и/или FcγRI человека по сравнению с антителом, содержащим Fc-область IgG дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанные антитела представляют собой искусственно полученные полностью человеческие антитела, например антитела, продуцируемые мышью или крысой, генетически модифицированные для продукции человеческих антител, например OMNIRAT или OMNIMOUSE (Ligand Pharmaceuticals). Такие антитела не встречаются в природе, но имеют каркас и константные области антител человека. Поскольку ВСМА человека является аутоантигеном, человеческий организм не вырабатывает антитела к ВСМА человека. Антитела человека против ВСМА могут представлять собой антитела, имеющие вариабельные и константные области, по существу соответствующие последовательностям иммуноглобулинов зародышевой линии человека, известным в данной области, включая, например, те, которые описаны Kabat et al. Антитела человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или в результате соматической мутации *in vivo*), например, в CDR, и, в частности, в CDR3. Предложенные в настоящем документе человеческие антитела против ВСМА могут иметь по меньшей мере одно, два, три, четыре, пять или более положений, замененных аминокислотным остатком, который не кодируется последовательностью иммуноглобулина зародышевой линии человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела, предложенные в настоящем документе, представляют собой моноклональные антитела. Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, то есть отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Этот термин можно использовать для обозначения такой гомогенной популяции антител. Моноклональные антитела являются высоко специфичными, они направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к своей специфичности моноклональные антитела имеют то преимущество, что они могут быть синтезированы культуре гибридомом, не загрязненные другими иммуноглобулинами. Определение "моноклональное" указывает на характер антитела, как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, предложенные в настоящем документе моноклональные антитела против ВСМА могут быть получены гибридомным способом, впервые описанным Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), или могут быть получены способами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с использованием методик, например, описанных в Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, предложенные в настоящем документе, например моноклональные антитела, представляют собой "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых участок тяжелой и/или легкой цепи является идентичным или гомологичным соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретных биологических видов, или отно-

сится к определенному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи (цепей) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого биологического вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также представляют собой фрагменты таких антител. Предпочтительно, чтобы такие химерные антитела проявляли желаемую биологическую активность, например связывались с ВСМА (патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). В некоторых вариантах осуществления изобретения предложенные в настоящем документе химерные антитела включают "приматизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности переменного домена, полученные из приматов, кроме человека (например, яванского макака, обезьян и т.д.), и последовательности константных областей антитела человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ВСМА-связывающие антитела, предложенные в настоящем документе, являются моновалентными. В других вариантах осуществления изобретения ВСМА-связывающие антитела, предложенные в настоящем документе, являются поливалентными, например двухвалентными, трехвалентными или четырехвалентными. В некоторых вариантах осуществления изобретения ВСМА-связывающие антитела, предложенные в настоящем документе, являются моноспецифичными. В других вариантах осуществления изобретения ВСМА-связывающие антитела, предложенные в настоящем документе, являются мультиспецифичными, например биспецифичными, триспецифичными и т.д. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложенные в настоящем документе ВСМА-связывающие антитела, которые являются поливалентными, связывают два или несколько эпитопов на ВСМА.

В некоторых других вариантах осуществления изобретения антитела, например, моноклональные антитела, предложенные в настоящем документе, могут являться гуманизированными антителами, которые могут быть получены с использованием методов рекомбинантных ДНК, известных в данной области. Описаны различные подходы к получению химерных антител. См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1985); Takeda et al., Nature 314:452 (1985), Cabilly et al., патент США № 4816567; Boss et al., патент США № 4816397; Tanaguchi et al., EP 0171496; EP 0173494, GB 2177096.

В других вариантах осуществления изобретения антитело, предложенное в настоящем документе, представляет собой биспецифичное антитело; то есть оно направлено на второй антиген в дополнение к ВСМА. "Биспецифичное" или "бифункциональное" антитело или иммуноглобулин представляет собой искусственное гибридное антитело или иммуноглобулин, имеющее две разные пары тяжелой/легкой цепей и два разных сайта связывания. Биспецифичные антитела можно получить различными способами, включая слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990). Для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов доступны многочисленные способы, известные специалистам в данной области. Например, антитела можно получить с использованием способов рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567). В недавнем прошлом было разработано большое количество форматов рекомбинантных биспецифичных антител (см., например, Kontermann RE, mAbs 4:2, (2012) 1-16). В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой диатело, биспецифичное антитело, биспецифичное антитело по технологии "выступы и впадины", биспецифичное антитело по технологии CrossMAB, например, где VL и VH или CH1 и CL одного или нескольких Fab-фрагментов поменяны местами, биспецифичный Fab₂ и/или биспецифичный (mab)₂ и т.п. В конкретном варианте осуществления anti-BCMA Fab включает технологию CrossMAB. В другом конкретном варианте указанный второй антиген представляет собой CD19.

В других конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой биспецифичный агент, взаимодействующий с Т-клетками. В более конкретном варианте осуществления вторым антигеном, на который нацелен активатор Т-клеток, является CD3. В других конкретных вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой биспецифичный агент, взаимодействующий с НК-клетками. В более конкретном варианте осуществления вторым антигеном, на который нацелен активатор НК-клеток, является NKG2D.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифичное антитело содержит не более двух Fab-фрагментов из анти-BCMA антитела и не более одного Fab-фрагмента из второго антитела, например, не более одного Fab-фрагмента анти-CD3-антитела, (схема "2+1"), необязательно, не более чем с одной Fc-частью.

В других вариантах осуществления в настоящем документе предложены фрагменты ВСМА-связывающих антител, например одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты или F'(ab)₂-фрагменты.

Кроме того, в настоящем документе предложены ВСМА-связывающие антитела в других конфигурациях, например, указанное антитело представляет собой или включает Triomab, kih IgG с общей легкой цепью, CrossMAB, например где VL и VH или CH1 и CL одного или нескольких Fab-фрагментов поменяны местами, орто-Fab IgG, DVD-Ig, 2 в 1-IgG, IgG-scFv, sdFv2-Fc, би-нанотело, TandAb, антитело на платформе с перепрограммируемой направленностью и двойной аффинностью (DART-платформе, например от Creative Biolabs), DART-Fc, scFv-HSA-scFv (где HSA представляет собой сывороточный альбумин человека), антитело с "запирающим связыванием" (dock-and-lock) (DNL)-Fab3, ImmTAC, DAF,

HSA body, IgG-финомер и ART-Ig.

6.3. Конъюгаты антитело-лекарственное средство.

В другом аспекте, в некоторых вариантах осуществления изобретения каждое или любое из антител или их ВСМА-связывающих фрагментов может быть конъюгировано с лекарственным средством, например, токсином или токсическим фрагментом, белком, полисахаридом или низкомолекулярным соединением, с образованием конъюгата антитела и лекарственного средства. В одном варианте осуществления изобретения лекарственное средство представляет собой, например, одно или несколько из антиапоптотического агента, митотического ингибитора, противоопухолевого антибиотика, иммуномодулирующего агента, нуклеиновой кислоты для генной терапии, алкилирующего агента, анти-ангиогенного агента, антимиетаболита, борсодержащего агента, химиопротекторного агента, гормонального агента, антигормонального агента, кортикостероида, фотоактивного терапевтического агента, олигонуклеотида, радионуклидного агента, радиосенсибилизатора, ингибитора топоизомеразы и ингибитора тирозинкиназы. В некоторых вариантах осуществления изобретения митотическим ингибитором является доластатин, ауристин, майтанзиноид и растительный алкалоид. В некоторых вариантах осуществления изобретения лекарственное средство представляет собой доластатин, ауристин, майтанзиноид и растительный алкалоид. Примером ауристинина является монометилауристин F (ММАF) или монометилауристин E (ММАЕ). Примеры майтанзиноидов включают, но не ограничиваются ими, DM1, DM2, DM3 и DM4. В некоторых вариантах осуществления изобретения противоопухолевый антибиотик выбирают из группы, состоящей из актиномицина, антрациклина, калихеамицина и дуокармицина. В некоторых вариантах осуществления изобретения актиномицин представляет собой пирролобензодиазепин (PBD).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых лекарственное средство представляет собой майтанзиноид, майтанзиноид представляет собой тиолсодержащий майтанзиноид, полученный, например, в соответствии со способами, раскрытыми в патенте США № 6333410. В конкретном варианте осуществления майтанзиноид представляет собой DM-1 (N2-деацетил-N2-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанзин). DM-1 в 3-10 раз более цитотоксичен, чем майтанзин, и может быть превращен в пролекарство путем связывания его через дисульфидную связь (связи) с анти-ВСМА антителом или его ВСМА-связывающим фрагментом, предложенными в настоящем документе. Некоторые из этих конъюгатов (иногда называемые "пролекарственными соединениями, активируемыми опухолью" (TAP)) не являются цитотоксическими в кровотоке, поскольку они активируются при связывании с клетками-мишенями и интернализируются в клетку, таким образом высвобождая лекарственное соединение. В других конкретных вариантах осуществления изобретения майтанзиноиды содержат боковую цепь, которая содержит стерически закрытую тиольную связь, такие как, помимо прочего, майтанзиноиды N2-деацетил-N2-(4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин, также именуемый "DM3" и N2-деацетил-N2-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил) майтанзин, также именуемый "DM4". DM4 отличается от DM1 и DM3 тем, что он несет металльные группы на своем αС. Это приводит к стерическим затруднениям, когда DM4 присоединяется через линкер, в частности, но не ограничиваясь этим, линкер, содержащий дисульфидную связь, к направляющему агенту, такому как nBT062. Большое разнообразие майтанзиноидов, несущих стерически закрытую тиольную группу (имеющую один или два заместителя, в частности алкильные заместители, такие как металльные заместители в DM4), раскрыты в публикации патента США № 2004/0235840, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Могут быть использованы другие эффекторные молекулы, содержащие заместители (такие как алкильные группы) в таких положениях, которые обеспечивают стерическую закрытость, когда эффектор присоединен к направляющему агенту через линкер. В некоторых конкретных вариантах осуществления эта закрытость вызывает химическую модификацию, такую как алкилирование свободного лекарственного соединения, для повышения его общей стабильности, что позволяет лекарственному соединению не только вызывать гибель клеток или постоянную блокировку клеточного цикла в опухолевых клетках, экспрессирующих ВСМА, но, необязательно, также могут воздействовать на вспомогательные клетки, которые, например, поддерживают или защищают опухоль от лекарственных средств, в частности, клетки стромы опухоли и сосудистой сети опухоли, и которые обычно не экспрессируют ВСМА, чтобы уменьшить или подавить их поддерживающую или защитную функцию. ДНК-алкилирующие агенты также могут быть использованы в качестве эффекторных молекул и включают, без ограничения, аналоги или производные СС-1065. СС-1065 представляет собой мощный противоопухолевый антибиотик, выделенный из культур *Streptomyces zelensis*, и было показано, что он исключительно цитотоксичен *in vitro* (патент США № 4169888).

В некоторых других конкретных вариантах осуществления изобретения лекарственное средство представляет собой таксан, например таксан, который содержит одну или несколько тиольных или дисульфидных групп. Таксаны ингибируют деполимеризацию тубулина, что приводит к увеличению скорости сборки микротрубочек и гибели клеток. Таксаны, которые могут быть использованы в конъюгатах антитело-лекарственное средство с представленными в настоящем документе антителами против ВСМА или их ВСМА-связывающими фрагментами, например, раскрыты в патентах США №№ 6436931, 6340701, 6706708 и публикациях патентов США №№ 2004/0087649, 2004/0024049 и 2003/0004210. Другие таксаны, которые могут быть использованы, раскрыты, например, в патентах США №№ 6002023, 5998656, 5892063, 5763477, 5705508, 5703247, 5367086 и 6596757.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лекарственное средство представляет собой помалидомид(4-амино-2-[(3RS)-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1H-изоиндол-1,3(2H)-дион). В другом конкретном варианте осуществления изобретения лекарственное средство представляет собой талидомид((RS)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1H-изоиндол-1,3(2H)-дион). В другом конкретном варианте осуществления изобретения лекарственное средство представляет собой леналидомид(3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион). В другом конкретном варианте осуществления изобретения лекарственное средство представляет собой 3-[4-(4-морфолин-4-илметилбензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-дион. В другом конкретном варианте осуществления изобретения цереблон-связывающее соединение, используемое в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляет собой 3-(4-((4-((2,4-дифторфенил)пиперазин-1-ил)метил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-дион. См., например, раскрытие этих соединений в публикации патентной заявки США № 2014/0162282, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Соединения для способов, предложенных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, иммуномодулирующие соединения (Celgene Corporation), группу соединений, которые могут быть полезны для лечения нескольких типов заболеваний человека, включая некоторые виды рака.

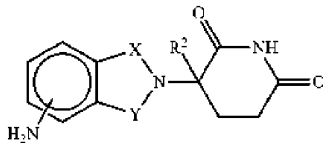
Используемый в настоящем документе (если не указано иное) термин "иммуномодулирующее соединение" может охватывать определенные небольшие органические молекулы, которые ингибируют индуцированную LPS продукцию моноцитами TNF- α , IL-1B, IL-12, IL-6, MIP-1 α , MCP-1, GM-CSF, G-CSF и COX-2. Эти соединения могут быть получены синтетическим путем или могут быть приобретены коммерчески.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лекарственное средство включает тетразамещенные 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолины, описанные в патенте США № 5798368; 1-оксо- и 1,3-диоксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолины (например, 4-метилпроизводные талидомида), замещенные 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)фталимиды и замещенные 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолы, включая, но не ограничиваясь ими, раскрытые в патентах США №№ 5635517, 6281230, 6316471, 6403613, 6476052 и 6555554; публикации № WO 02/059106). Полное содержание каждого из патентов и патентных заявок, указанных в настоящем документе, включено посредством ссылки.

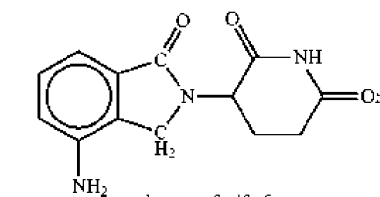
Различные описанные в настоящем документе соединения содержат один или несколько хиральных центров и могут существовать в виде рацемических смесей энантиомеров или смесей диастереомеров. Таким образом, в настоящем документе также предложено использование стереомерно чистых форм таких соединений, а также использование смесей этих форм. Например, можно использовать смеси, содержащие равные или неравные количества энантиомеров определенных иммуномодулирующих соединений. Эти изомеры могут быть синтезированы асимметрично или разделены с использованием стандартных методик, таких как хиральные колонки или хиральные разделяющие агенты. См., например, Jacques, J., et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley-Interscience, New York, 1981); Wilen, S. H., et al., *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E. L., *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); и Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E. L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, Ind., 1972).

Иммуномодулирующие соединения, предложенные в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, 1-оксо-1,3-диоксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолины, замещенные аминогруппой в бензольном кольце, как описано в патенте США № 5635517, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

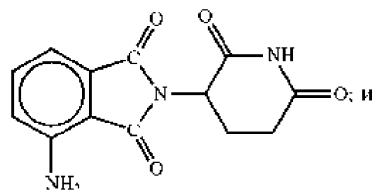
Эти соединения имеют структуру I:



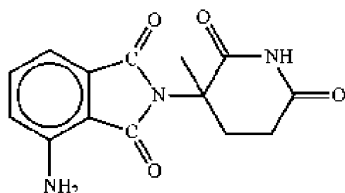
в которой один из X и Y представляет собой C=O, другой из X и Y представляет собой C=O или CH₂, и R² представляет собой водород или низший алкил, в частности метил. Конкретные иммуномодулирующие соединения включают, но не ограничиваются ими:



1-оксо-2-(2,6-
дioxoпиперидин-3-ил)-4-аминоизоиндолин



1,3-дioxo-2-(2,6-дioxoпиперидин-3-
ил)-4-аминоизоиндолин

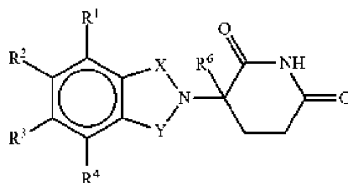


1,3-дioxo-2-(3-метил-2,6-
дioxoпиперидин-3-ил)-4-аминоизоиндолин

и их оптически чистые изомеры.

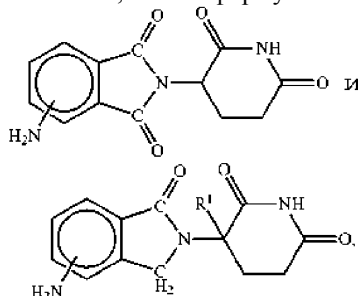
Соединения могут быть получены стандартными способами синтеза (см., например, патент США № 5635517, включенный в настоящий документ посредством ссылки). Соединения также доступны от Celgene Corporation, Warren, NJ.

Другие лекарственные средства, используемые в описанных в настоящем документе композициях, относятся к классу замещенных 2-(2,6-дioxoпиперидин-3-ил)фталимидов и замещенных 2-(2,6-дioxoпиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолов, таких как описанные в патентах США №№ 6281230, 6316471, 6335349 и 6476052, и международной патентной заявке № PCT/US97/13375 (международная публикация № WO 98/03502), каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки. Типичные соединения имеют формулу:



в которой: один из X и Y представляет собой C=O, а другой из X и Y представляет собой C=O или CH₂; (i) каждый из R¹, R², R³ и R⁴, независимо от других, представляет собой галоген, алкил с 1-4 атомами углерода или алкоксигруппу с 1-4 атомами углерода, или (ii) один из R¹, R², R³ и R⁴ представляют собой -NHR⁵, а оставшиеся из R¹, R², R³ и R⁴ представляют собой водород; R⁵ представляет собой водород или алкил с 1-8 атомами углерода; R⁶ представляет собой водород, алкил с 1-8 атомами углерода, бензил или галоген; при условии, что R⁶ не является водородом, если X и Y представляют собой C=O, и (i) каждый из R¹, R², R³ и R⁴ представляет собой фтор, или (ii) один из R¹, R², R³ или R⁴ является аминогруппой.

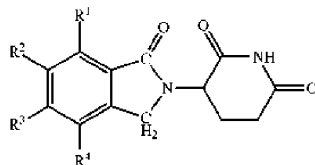
Соединения, представляющие этот класс, имеют формулы:



где R¹ представляет собой водород или метил. В отдельном варианте осуществления в настоящем документе предложено использование энантиомерно чистых форм (например, оптически чистых (R) или

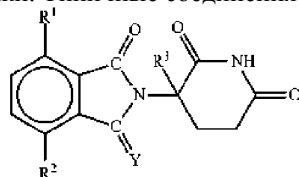
(S) энантимеров) этих соединений.

Другими специфическими иммуномодулирующими соединениями являются тетразамещенные 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолины, описанные в патенте США № 5798368, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Типичные соединения имеют формулу:



где каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 , независимо от других, представляет собой галоген, алкил с 1-4 атомами углерода или алкоксигруппу с 1-4 атомами углерода.

Другими конкретными иммуномодулирующими соединениями являются 1-оксо- и 1,3-диоксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолины, раскрытые в патенте США № 6403613, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Типичные соединения имеют формулу:

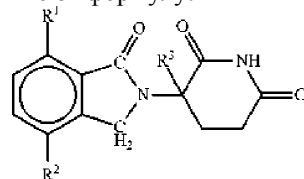


в которой Y представляет собой кислород или H_2 ,

первый из R^1 и R^2 представляет собой галоген, алкил, алкоксигруппу, алкиламиногруппу, диалкиламиногруппу, цианогруппу или карбамоильную группу, второй из R^1 и R^2 , независимо от первого, представляет собой водород, галоген, алкил, алкоксигруппу, алкиламиногруппу, диалкиламиногруппу, цианогруппу или карбамоильную группу, и

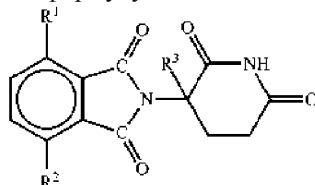
R^3 представляет собой водород, алкил или бензил.

Конкретные примеры соединений имеют формулу:



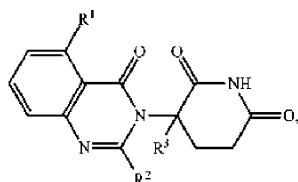
где первый из R^1 и R^2 представляет собой галоген, алкил, содержащий от 1 до 4 атомов углерода, алкоксигруппу, содержащую от 1 до 4 атомов углерода, диалкиламиногруппу, в которой каждый алкил имеет от 1 до 4 атомов углерода, цианогруппу или карбамоильную группу; второй из R^1 и R^2 , независимо от первого, представляет собой водород, галоген, алкил, содержащий от 1 до 4 атомов углерода, алкоксигруппу, содержащую от 1 до 4 атомов углерода, алкиламиногруппу, в которой алкил содержит от 1 до 4 атомов углерода, диалкиламиногруппу, в которой каждый алкил содержит от 1 до 4 атомов углерода, цианогруппу или карбамоильную группу; и R^3 представляет собой водород, алкил, содержащий от 1 до 4 атомов углерода, или бензил. Конкретные примеры включают, но не ограничиваются ими, 1-оксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-метилизоиндолин.

Другие типичные соединения имеют формулу:



где: первый из R^1 и R^2 представляет собой галоген, алкил, содержащий от 1 до 4 атомов углерода, алкоксигруппу, содержащую от 1 до 4 атомов углерода, диалкиламиногруппу, в которой каждый алкил содержит от 1 до 4 атомов углерода, цианогруппу или карбамоильную группу; второй из R^1 и R^2 , независимо от первого, представляет собой водород, галоген, алкил, содержащий от 1 до 4 атомов углерода, алкоксигруппу, содержащую от 1 до 4 атомов углерода, алкиламиногруппу, в которой алкил содержит от 1 до 4 атомов углерода, диалкиламиногруппу, в которой каждый алкил содержит от 1 до 4 атомов углерода, цианогруппу или карбамоильную группу; и R^3 представляет собой водород, алкил, содержащий от 1 до 4 атомов углерода, или бензил.

Другие конкретные соединения, предложенные в настоящем документе, имеют формулу:



и их фармацевтически приемлемые соли, сольваты и стереоизомеры, где:

R^1 представляет собой: водород; галоген; $-(CH_2)_nOH$; (C_1-C_6) алкил, необязательно замещенный одним или несколькими галогенами; (C_1-C_6) алкоксигруппу, необязательно замещенную одним или несколькими галогенами; или

$-(CH_2)_nNHR^a$, где R^a представляет собой:

водород;

(C_1-C_6) алкил, необязательно замещенный одним или несколькими галогенами;

$-(CH_2)_n$ -(6-10-членный арил);

$-C(O)-(CH_2)_n$ -(6-10-членный арил) или $-C(O)-(CH_2)_n$ -(6-10-членный гетероарил), где арил или гетероарил необязательно замещен одним или несколькими из: галогена; $-SCF_3$; (C_1-C_6) алкила, самого необязательно замещенного одним или несколькими галогенами; или (C_1-C_6) алкоксигруппы, самой необязательно замещенной одним или несколькими галогенами;

$-C(O)-(C_1-C_8)$ алкил, где алкил необязательно замещен одним или несколькими галогенами;

$-C(O)-(CH_2)_n$ -(C_3-C_{10} -циклоалкил);

$-C(O)-(CH_2)_nNR^bR^c$, где R^b и R^c , каждый независимо, представляют собой: водород;

(C_1-C_6) алкил, необязательно замещенный одним или несколькими галогенами;

(C_1-C_6) алкоксигруппу, необязательно замещенную одним или несколькими галогенами; или

6-10-членный арил, необязательно замещенный одним или несколькими из следующих групп: галогена;

(C_1-C_6) алкила, самого необязательно замещенного одним или несколькими галогенами; или

(C_1-C_6) алкоксигруппы, самой необязательно замещенной одним или несколькими галогенами;

$-C(O)-(CH_2)_n-O$ -(C_1-C_6)алкил; или

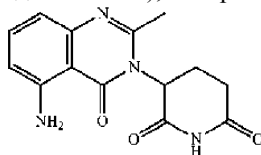
$-C(O)-(CH_2)_n-O$ -(CH_2) $_n$ -(6-10-членный арил);

R^2 представляет собой: водород; $-(CH_2)_nOH$; фенил, $-O$ -(C_1-C_6)алкил; или (C_1-C_6) алкил, необязательно замещенный одним или несколькими галогенами;

R^3 представляет собой водород; или (C_1-C_6) алкил, необязательно замещенный одним или несколькими галогенами; и

n имеет значение 0, 1 или 2.

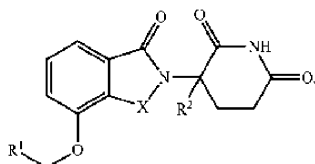
Конкретные примеры включают, но не ограничиваются ими, 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)пиперидин-2,6-дион ("Соединение А"), которое имеет следующую структуру:



или его энантиомер, или смесь его энантиомеров, или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

Соединение А может быть получено в соответствии со способами, описанными в разделе Примеры, представленном в настоящем документе, или как описано в патенте США № 7635700, раскрытие которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Соединение также может быть синтезировано другими способами, очевидными для специалистов в данной области, на основе представленных в настоящем документе идей. В некоторых вариантах осуществления соединение А находится в кристаллической форме, описанной в предварительной патентной заявке США № 61/451806, поданной 11 марта 2011 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения гидрохлоридная соль соединения А используется в способах, предложенных в настоящем документе. Способы лечения, профилактики и/или контроля раковых и других заболеваний с использованием соединения А описаны в патенте США № 8802685, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Другие конкретные соединения, предложенные в настоящем документе, имеют формулу:



или являются его фармацевтически приемлемыми солью, сольватом или стереоизомером, где:

X представляет собой C=O или CH₂;

R¹ представляет собой Y-R₃;

R² представляет собой H или (C₁-C₆)алкил;

Y представляет собой 6-10-членный арил, гетероарил или гетероцикл, каждый из которых может быть необязательно замещен одним или несколькими галогенами; или связь;

R³ представляет собой:

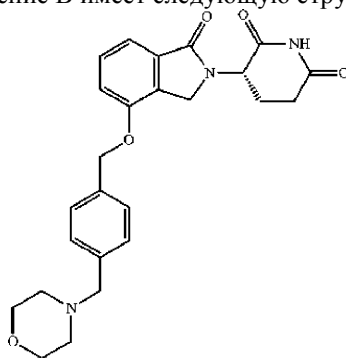
-(CH₂)_n-арил, -O-(CH₂)_n-арил или -(CH₂)_n-O-арил, где арил необязательно замещен одним или несколькими из: (C₁-C₆)алкила, самого необязательно замещенного одним или несколькими галогенами; (C₁-C₆)алкоксигруппы, самой замещенный одним или несколькими галогенами; оксогруппы; аминогруппы; карбоксильной группы; цианогруппы; гидроксильной группы; галогена; дейтерия; 6-10-членного арила или гетероарила, необязательно замещенного одним или несколькими (C₁-C₆)алкилами, (C₁-C₆)алкоксигруппами или галогенами; -CONH₂; или -COO-(C₁-C₆)алкила, где алкил может быть необязательно замещен одним или несколькими галогенами;

-(CH₂)_n-гетероцикл, -O-(CH₂)_n-гетероцикл или -(CH₂)_n-O-гетероцикл, где гетероцикл необязательно замещен одним или несколькими из: (C₁-C₆)алкила, самого необязательно замещенного одним или несколькими галогенами; (C₁-C₆)алкоксигруппы, самой замещенный одним или несколькими галогенами; оксогруппы; аминогруппы; карбоксильной группы; цианогруппы; гидроксильной группы; галогена; дейтерия; 6-10-членного арила или гетероарила, необязательно замещенного одним или несколькими (C₁-C₆)алкилами, (C₁-C₆)алкоксигруппами или галогенами; -CONH₂; или -COO-(C₁-C₆)алкила, где алкил может быть необязательно замещен одним или несколькими галогенами; или

-(CH₂)_n-гетероарил, -O-(CH₂)_n-гетероарил или -(CH₂)_n-O-гетероарил, где гетероарил необязательно замещен одним или несколькими из: (C₁-C₆)алкила, самого необязательно замещенного одним или несколькими галогенами; (C₁-C₆)алкоксигруппы, самой замещенный одним или несколькими галогенами; оксогруппы; аминогруппы; карбоксильной группы; цианогруппы; гидроксильной группы; галогена; дейтерия; 6-10-членного арила или гетероарила, необязательно замещенного одним или несколькими (C₁-C₆)алкилами, (C₁-C₆)алкоксигруппами или галогенами; -CONH₂; или -COO-(C₁-C₆)алкила, где алкил может быть необязательно замещен одним или несколькими галогенами; и

n имеет значение 0, 1, 2 или 3.

Конкретные примеры включают, но не ограничиваются ими, 3-(4-((4-(морфолинометил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-дион. В одном из вариантов осуществления изобретения соединение представляет собой (S) стереоизомер 3-(4-((4-(морфолинометил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-диона ("Соединение В") например, для использования в описанных в настоящем документе способах. Рацемический 3-(4-((4-(морфолинометил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-дион и способы его получения описаны в патентной публикации США № 2011/0196150, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Соединение В имеет следующую структуру:



Все описанные соединения можно либо приобрести у компаний, либо получить в соответствии со способами, описанными в патентах или патентных публикациях, раскрытых в настоящем документе. Кроме того, оптически чистые соединения могут быть синтезированы асимметрично или разделены с использованием известных разделяющих агентов или хиральных колонок, а также других стандартных методов синтетической органической химии. Дополнительную информацию об иммуномодулирующих соединениях, их получении и применении можно найти, например, в публикациях патентных заявок США №№ US 20060188475, US 20060205787 и US 20070049618, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В случае несоответствия между изображенной структурой и названием, данным этой структуре, структура на изображении имеет больший вес. Кроме того, если стереохимия структуры или части структуры не обозначена, например, жирными или пунктирными линиями, то структура или участок структуры должны интерпретироваться как охватывающие все ее стереоизомеры.

6.4. Химерные антигенные рецепторы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения любое из антител против ВСМА или их

BCMA-связывающих участков включено в химерный антигенный рецептор, например, в виде направляющего на BCMA домена или части направляющего на BCMA домена. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит фрагмент связывающего BCMA антитела, предложенного в настоящем документе, например, одноцепочечный Fv-фрагмент или Fab-фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой искусственные мембраносвязанные белки, которые направляют Т-лимфоциты или естественные киллеры (NK) к антигену, например, BCMA, и стимулируют Т-лимфоциты или NK-клетки на уничтожение клетки, представляющей антиген, например BCMA. См., например, Eshhar, патент США № 7741465. Как минимум, указанные в настоящем документе CAR содержат внеклеточный домен, который связывается с BCMA; трансмембранный домен и внутриклеточный (цитоплазматический) сигнальный домен, который передает сигнал первичной активации иммунной клетке. При соблюдении всех других условий, когда CAR экспрессируется на поверхности, например, Т-лимфоцита, и внеклеточный домен CAR связывается с BCMA, внутриклеточный сигнальный домен передает сигнал Т-лимфоциту для активации и/или пролиферации, и, если BCMA присутствует на поверхности клетки, для уничтожения клетки, экспрессирующей BCMA.

Поскольку Т-лимфоцитам для полной активации требуется по меньшей мере два сигнала, первичный сигнал активации и костимулирующий сигнал, обычно CAR также содержат костимулирующий домен, так что связывание внеклеточного домена с BCMA на поверхности клетки приводит к передаче как первичного сигнала активации, так и костимулирующего сигнала.

В некоторых вариантах осуществления изобретения внутриклеточный домен CAR представляет собой или включает внутриклеточный домен или мотив белка, который экспрессируется Т-лимфоцитами и запускает активацию и/или пролиферацию указанных Т-лимфоцитов. Такой домен или мотив способен передавать первичный антигенсвязывающий сигнал, который необходим для активации Т-лимфоцита в ответ на связывание антигена с внеклеточной частью CAR. Обычно этот домен или мотив содержит или представляет собой ITAM (мотив активации иммунорецепторного тирозина). ITAM-содержащие полипептиды, подходящие для CAR, включают, например, дзета-цепь CD3 (CD3 ζ) или ее участки, содержащие ITAM. В конкретном варианте осуществления внутриклеточный домен представляет собой внутриклеточный сигнальный домен CD3 ζ . В других конкретных вариантах осуществления изобретения внутриклеточный домен происходит из цепи рецептора лимфоцитов, комплексного белка TCR/CD3, субъединицы рецептора Fc или субъединицы рецептора IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения первичный сигнальный домен представляет собой или содержит сигнальный домен из TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278, Fc ϵ RI, DAP10, DAP12 или CD66d.

В некоторых вариантах осуществления изобретения CAR дополнительно содержит один или несколько костимулирующих доменов или мотивов, например, в качестве части внутриклеточного домена полипептида. Один или несколько костимулирующих доменов или мотивов могут представлять собой или содержать одну или несколько последовательности костимулирующего полипептида CD27, последовательности костимулирующего полипептида CD28, последовательности костимулирующего полипептида OX40 (CD134), последовательности костимулирующего полипептида 4-1BB (CD137) или последовательности индуцируемого костимулирующего Т-клеточного (ICOS) полипептида, или другого костимулирующего домена или мотива. В некоторых других вариантах осуществления изобретения костимулирующий домен представляет собой или включает функциональный сигнальный домен, полученный из одной или нескольких молекул MHC класса I, TNF-рецептора, иммуноглобулиноподобного белка, цитокинического рецептора, интегрина, сигнальной молекулы активации лимфоцитов (белка SLAM), активирующего NK-клеточного рецептора, BTLA, рецептора Toll-лиганда,

CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CD5, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), B7-H3, CD5, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8a α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96, CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76 или PAG/Cbp.

Трансмембранная область может представлять собой любую трансмембранную область, которая может быть включена в функциональный CAR, обычно трансмембранную область из молекулы CD4 или CD8. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен CAR происходит из белка иммунной системы, который обычно передает ингибирующий сигнал таким клеткам иммунной системы, например, трансмембранного домена из CTLA4 (цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена 4 или цитотоксического Т-лимфоцитарно-ассоциированного белка 4) или PD-1 (белка программируемой смерти-1).

В некоторых вариантах осуществления изобретения любой из предложенных в настоящем документе Т-лимфоцитов, которые содержат множество полипептидов клеточной смерти, содержат трансмембранный домен из CTLA4 или PD-1. В конкретном варианте осуществления изобретения Т-лимфоцит, экспрессирующий указанный полипептид или любой из таких полипептидов, описанных в данном документе, активируется или стимулируется к пролиферации, когда указанный полипептид связывается с указанным антигеном. В конкретном варианте осуществления изобретения полипептид, когда он экспрессируется на поверхности Т-лимфоцита, направляет Т-лимфоцит на уничтожение клетки, экспрессирующей указанный антиген.

В конкретных вариантах осуществления изобретения любого из полипептидов в данном документе, в которых трансмембранный домен полипептида происходит из CTLA4, трансмембранный домен CTLA4 получают из CTLA4 млекопитающих, например человека, приматов или грызунов, например, мышино CTLA4. Предпочтительно, чтобы трансмембранный домен не содержал аминокислот из внутриклеточного домена, внеклеточного домена или внутриклеточного или внеклеточного домена CTLA4 или PD-1. Конкретные неограничивающие примеры последовательностей трансмембранного домена CTLA4 или PD-1 представлены ниже.

В конкретном варианте осуществления трансмембранный домен CTLA4 представляет собой полипептидную последовательность, кодируемую экзоном 3 гена CTLA4 человека. В другом конкретном варианте осуществления трансмембранный домен CTLA4 представляет собой или содержит аминокислотную последовательность PEPCDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKM (в трехбуквенном коде

Pro-Glu-Pro-Cys-Pro-Asp-Ser-Asp-Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Val-Ser-Leu-Ser-Lys-Met)

(SEQ ID NO: 61). В другом конкретном варианте осуществления трансмембранный домен CTLA4 представляет собой полипептидную последовательность, кодируемую нуклеотидами 610-722 из последовательности с регистрационным номером GenBank NM_005214.4 или содержит ее. В другом конкретном варианте осуществления трансмембранный домен CTLA4 представляет собой или включает аминокислотную последовательность PDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL (в трехбуквенном коде

Pro-Asp-Ser-Asp-Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Val-Ser-Leu)

(SEQ ID NO: 62). В другом конкретном варианте осуществления трансмембранный домен CTLA4 представляет собой полипептидную последовательность, кодируемую нуклеотидами 636-699 из последовательности с регистрационным номером GenBank NM_005214.4 или содержит ее. В другом конкретном варианте осуществления трансмембранный домен CTLA4 представляет собой или содержит аминокислотную последовательность FLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAV (в трехбуквенном коде

Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Val)

(SEQ ID NO: 63). См., например, ссылку на белок с регистрационным номером ENSP00000303939.3 в базе Ensembl. В другом конкретном варианте осуществления трансмембранный домен CTLA4 представляет собой или включает полипептидную последовательность FLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (в трехбуквенном коде

Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Ser-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Leu-Thr)

(SEQ ID NO: 64), см., например, последовательность с регистрационным номером UNIPROT P16410.

В другом конкретном варианте осуществления трансмембранный домен CTLA4 представляет собой или содержит полипептидную последовательность FLLWILVAVSLGLFFYSFLVAVSL (в трехбуквенном коде

Phe-Leu-Leu-Trp-Ile-Leu-Val-Ala-Val-Ser-Leu-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Ser-Phe-Leu-Val-Ser-Ala-Val-Ser-Leu-Ser)

(SEQ ID NO: 65). См., например, Shin et al., Blood 119:5678-5687 (2012). В другом конкретном варианте осуществления трансмембранный домен PD-1 представляет собой или содержит аминокислотную последовательность TLVVGVGGLLGSLLVLLVWVLAIVCSRAA (в трехбуквенном коде

Thr-Leu-Val-Val-Gly-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Ser-Leu-Val-Leu-Leu-Val-Trp-Val-Leu-Ala-Val-Ile-Cys-Ser-Arg-Ala-Ala)

(SEQ ID NO: 66). См. Finger et al., Gene 197 (1-2): 177-187 (1997). В другом конкретном варианте осуществления трансмембранный домен PD-1 представляет собой или содержит аминокислотную последовательность VGVVGGLLGSLLVLLVWVLAIV (в трехбуквенном коде

Val-Gly-Val-

Val-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Ser-Leu-Val-Leu-Leu-Val-Trp-Val-Leu-Ala-Val-Ile)

(SEQ ID NO: 67). См., например, последовательность с регистрационным номером UNIPROT Q15116. В другом конкретном варианте осуществления трансмембранный домен PD-1 представляет собой или содержит аминокислотную последовательность FQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (в трехбуквенном коде

Phe-Glu-Thr-Leu-Val-Val-

Gly-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Ser-Leu-Val-Leu-Leu-Val-Trp-Val-Leu-Ala-Val-Ile)

(SEQ ID NO: 68). См., например, последовательность с регистрационным номером GenBank NM_005018.2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая один из трансмембранных полипептидов, раскрытые в настоящем документе, содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует любую из аминокислотных последовательностей, раскрытых в SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68. В другом конкретном варианте осуществления трансмембранный домен PD-1 представляет собой или содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 последовательных аминокислот, раскрытую в SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, которая кодирует один из раскрытых в настоящем документе полипептидов, включает нуклеотидную последовательность, которая кодирует по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 последовательных аминокислот, раскрытых в SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68. При конструировании полипептида, например CAR, в некоторых вариантах осуществления изобретения последовательности, принадлежащие человеку, могут быть объединены с последовательностями, принадлежащими животным. Например, полипептид, например CAR, содержащий аминокислотные последовательности внеклеточного и внутриклеточного доменов белка человека, может включать трансмембранный домен из белка биологического вида, кроме человека; например, может содержать трансмембранный домен CTLA4 мыши или трансмембранный домен PD-1 мыши. В более конкретном варианте осуществления изобретения может включать трансмембранный домен CTLA4 мыши или трансмембранный домен PD-1 мыши. В более конкретном варианте осуществления изобретения полипептид, например CAR, содержит аминокислотные последовательности, принадлежащие человеку, для внеклеточного и внутриклеточного доменов и содержит трансмембранный домен, имеющий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65.

6.5. Фармацевтические композиции.

В другом аспекте в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие любое из антител против ВСМА или их ВСМА-связывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления изобретения составы анти-ВСМА антител или их ВСМА-связывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе, изготавливают для хранения и применения путем объединения очищенного связывающего агента по настоящему изобретению с фармацевтически приемлемым носителем (например, носителем или наполнителем). Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются ими, нетоксичные буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; соли, такие как хлорид натрия; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты, такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол; полипептиды с низкой молекулярной массой (например, менее примерно 10 аминокислотных остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; углеводы, такие как моносахариды, дисахариды, глюкоза, манноза или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов, такие как комплексы Zn-белок; и неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN или полиэтиленгликоль (ПЭГ). (См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, 2012, Pharmaceutical Press, London).

Предложенные в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть составлены для введения любым способом для местного или системного лечения. Предложенные в настоящем документе фармацевтические составы могут быть составлены для местного применения, например, в виде эпидермальных или трансдермальных пластырей, мазей, лосьонов, кремов или гелей; или в форме капель, суппозиторий, спреев, жидкостей и порошков; для легочного введения путем ингаляции или инсуффля-

ции, в том числе с помощью небулайзера, или интратрахеального или интраназального введения; или для парентерального введения, включая внутривенное, внутриартериальное, внутриопухоловое, подкожное, внутрибрюшинное, внутримышечное (например, инъекция или инфузия) или внутричерепное (например, интратекальное или внутримозговое) введение.

Терапевтический состав антител против ВСМА или их ВСМА-связывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе, может представлять собой стандартную лекарственную форму. Такие составы включают таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, растворы или суспензии в воде или неводной среде, или суппозитории, или пластиковые пакеты для крови или аналогичные устройства, подходящие, например, для однократного внутривенного или внутриартериального введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела против ВСМА или их ВСМА-связывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, заключены в микрокапсулы. Такие микрокапсулы получают, например, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и полиметилметацрилатные микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсиях, как описано в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, 2012, Pharmaceutical Press, London.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические составы, предложенные в настоящем документе, включают одно или несколько антител против ВСМА или их ВСМА-связывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе, в комплексе с липосомами. Способы получения липосом известны специалистам в данной области. Например, некоторые липосомы можно получить путем испарения в обращенной фазе с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-модифицированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы можно экструдировать через фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы желаемого диаметра.

6.6. Полинуклеотиды и способы получения полипептидов и антител.

В другом аспекте в настоящем документе предложены полинуклеотиды, например, полинуклеотидные последовательности, которые кодируют любое из антител против ВСМА или их ВСМА-связывающие фрагменты, включая тяжелые или легкие цепи, и/или последовательности CDR для каждой цепи. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены полинуклеотиды, содержащие полинуклеотиды, которые кодируют полипептид (или фрагмент полипептида), который специфично связывает ВСМА. Термин "полинуклеотиды, кодирующие полипептид" охватывает полинуклеотид, который включает только кодирующие последовательности для полипептида, а также полинуклеотид, который включает дополнительные кодирующие и/или некодирующие последовательности. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему полинуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело к ВСМА человека или кодирует фрагмент такого антитела (например, фрагмент, содержащий сайт связывания ВСМА). Полинуклеотиды по изобретению могут находиться в форме РНК или в форме ДНК. В конкретных вариантах осуществления ДНК может представлять собой, например, кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК; и может быть двуцепочечной или одноцепочечной, и, в одноцепочечной форме может быть кодирующей цепью или некодирующей (антисмысловой) цепью.

В конкретных вариантах осуществления изобретения полинуклеотиды, предложенные в настоящем документе, кодируют переменную область легкой цепи антитела, содержащую, состоящую в основном из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5.

В других конкретных вариантах осуществления изобретения полинуклеотиды, предложенные в настоящем документе, кодируют переменную область тяжелой цепи антитела, содержащую, состоящую в основном из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 60.

В других конкретных вариантах осуществления изобретения полинуклеотиды, предложенные в настоящем документе, кодируют переменную область легкой цепи антитела, содержащую, состоящую в основном из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5, и кодируют цепь переменной области тяжелой цепи антитела, содержащую, состоящую в основном из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16. В других конкретных вариантах осуществления изобретения полинуклеотиды, предложенные в настоящем документе, кодируют переменную область легкой цепи антитела, содержащую, состоящую в основном из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5, и кодируют переменную область тяжелой цепи антитела, содержащую, состоящую в основном из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 27. В других конкретных вариантах осуществления изобретения полинуклеотиды, предложенные в настоящем документе, кодируют переменную область легкой цепи антитела, содержащую, состоящую в основном из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5, и кодируют переменную область тяжелой цепи антитела, содержащую, состоящую в основном из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 38. В других конкретных вариантах осуществления изобретения полинуклеотиды, предложенные в настоящем документе, кодируют переменную область легкой цепи антитела, содержащую, состоящую в основном из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID

NO: 5, и кодируют вариабельную область тяжелой цепи антитела, содержащую, состоящую в основном из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 49. В других конкретных вариантах осуществления изобретения полинуклеотиды, предложенные в настоящем документе, кодируют вариабельную область легкой цепи антитела, содержащую, состоящую в основном из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5, и кодируют вариабельную область тяжелой цепи антитела, содержащую, состоящую в основном из или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 60.

Любой из полинуклеотидов, предложенных в настоящем документе, может содержаться в полинуклеотидном векторе и/или экспрессироваться с него. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор содержится в клетке-хозяине. Такая клетка-хозяин после трансформации или трансфекции вектором, предложенным в настоящем документе, экспрессирует или способна экспрессировать полинуклеотидные последовательности, кодирующие антитела против ВСМА, предложенные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотиды, предложенные в настоящем документе, функционально связаны с одной или несколькими регуляторными последовательностями в векторе, чтобы обеспечить экспрессию ВСМА-связывающего антитела.

Термин "вектор", используемый в данном документе, означает молекулу нуклеиновой кислоты, используемую в качестве носителя для переноса генетического материала в клетку, и охватывает, без ограничения, плазмиды, вирусные геномы (включая неспособные к репликации вирусные геномы и вирусные геномы в нескольких сегментах), космиды и искусственные хромосомы. В общем, сконструированные векторы содержат точку инициации репликации, участок с множеством сайтов для клонирования и селективный маркер. Сам вектор обычно представляет собой нуклеотидную последовательность, обычно последовательность ДНК, которая содержит вставку (трансген, например, любую из описанных в настоящем документе последовательностей, кодирующих антитело против ВСМА) и более длинную последовательность, которая служит каркасом вектора. Векторы могут включать дополнительные функции, помимо вставки трансгена и каркаса: промотор, генетический маркер, устойчивость к антибиотику, репортерный ген, направляющую последовательность, тег для очистки белка. Векторы, называемые экспрессионными векторами, обеспечивают экспрессию трансгена в клетке-мишени и обычно имеют регуляторные последовательности, такие как промоторная последовательность, которая управляет экспрессией трансгена. Встраивание вектора в клетку-мишень обычно называется "трансформацией" для бактериальных клеток и "трансфекцией" для эукариотических клеток; также, вставка вирусного вектора в клетку млекопитающего называется "трансдукцией".

Используемый в настоящем документе термин "клетка-хозяин" относится к клетке, в которую полинуклеотид, кодирующий ВСМА-связывающее антитело, предложенное в настоящем документе, вводится посредством трансформации, трансфекции и т.п. Этот термин относится не только к конкретным клеткам, которые трансфицируются, трансформируются или трансдуцируются, но и к потомкам таких клеток. Поскольку определенные модификации могут возникать в последующих поколениях из-за мутаций или влияния окружающей среды, такое потомство может не быть идентичным родительским клеткам, но по-прежнему входит в объем используемого в настоящем документе термина.

Используемый в настоящем документе термин "экспрессия" включает любую стадию, участвующую в продукции связывающей молекулы по изобретению, включая, но не ограничиваясь, транскрипцию (например, с полинуклеотида, предложенного в настоящем документе, или полинуклеотида, кодирующего ВСМА-связывающее антитело или его ВСМА-связывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе), и, в некоторых вариантах осуществления изобретения, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию и секрецию, например, ВСМА-связывающего антитела или его ВСМА-связывающего фрагмента, предложенных в настоящем документе.

Термин "регуляторные последовательности" относится к нуклеотидным последовательностям, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Регуляторные последовательности, которые подходят для прокариот, например, включают промотор, необязательно, операторную последовательность и сайт связывания рибосомы. Известно, что эукариотические клетки используют, а вектор может содержать: промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

В данном контексте нуклеиновая кислота или полинуклеотид "функционально связаны", когда они находятся в функциональной связи с другой нуклеотидной последовательностью. Например, нуклеотидная последовательность промотора функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей ВСМА-связывающее антитело или его ВСМА-связывающий фрагмент, если промотор управляет экспрессией ВСМА-связывающего антитела или его ВСМА-связывающего фрагмента; или, в качестве другого примера, нуклеотидная последовательность для пре-последовательности или секреторного лидера функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если она экспрессируется в виде пребелка, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связаны с кодирующей последовательностью, если они влияют на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он рас-

положен так, чтобы способствовать трансляции. Обычно "функционально связанный" означает, что связанные последовательности нуклеиновых кислот являются смежными, а в случае секреторного лидера являются смежными и находятся в одной и той же рамке считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть смежными. Связывание можно осуществлять, например, лигированием по удобным сайтам рестрикции. Если такие сайты не существуют, используются синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры в соответствии с общепринятой практикой.

Термины "клетка-хозяин", "клетка-мишень" или "клетка-реципиент" включают любую отдельную клетку или культуру клеток, которые могут быть или были реципиентами для векторов или для включения экзогенных молекул нуклеиновых кислот, полинуклеотидов и/или белков. Эти термины также включают потомство одной клетки, и это потомство необязательно должно быть полностью идентичным (по морфологии, геномной или общей ДНК) исходной родительской клетке из-за естественной, случайной или преднамеренной мутации. Клетки могут быть прокариотическими или эукариотическими и включать, помимо прочего, бактериальные клетки, дрожжевые клетки, клетки животных и клетки млекопитающих, например мыши, крысы, макака или человека. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические и эукариотические клетки-хозяева, включая дрожжи, грибы, клетки насекомых и клетки млекопитающих.

Антитела или их фрагменты могут продуцироваться бактериями. После экспрессии связывающая молекула по изобретению, предпочтительно, выделяется из осадка клеток *E. coli* в растворимой фракции и может быть очищена, например, с помощью аффинной хроматографии и/или гель-хроматографии. Окончательную очистку можно проводить аналогично процессу очистки антител, экспрессируемых, например, в клетках СНО.

В дополнение к прокариотам, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии связывающей молекулы по изобретению являются эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, наиболее часто используются из низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако ряд других родов, видов и штаммов обычно доступны и подходят для применения в настоящем изобретении, такие как *Schizosaccharomyces pombe*, клетки-хозяева *Kluveromyces*, такие как, например, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis* и мицелиальные грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, и клетки-хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированной связывающей молекулы по изобретению, предпочтительно, связывающих молекул, полученных из антител, происходят из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные штаммы и варианты бакуловирусов и соответствующие пермиссивные клетки-хозяева насекомых, такие как *Spodoptera frugiperda* (гусеница совки), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombux mori*. Разнообразные вирусные штаммы для трансфекции являются общедоступными, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 у *Bombux mori* NPV, и такие вирусы могут использоваться в качестве вируса в настоящем документе согласно настоящему изобретению, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Культуры растительных клеток хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата, *Arabidopsis* или табака также можно использовать в качестве хозяев. Векторы для клонирования и экспрессии, применимые для продукции белков в культуре растительных клеток, известны специалистам в данной области. См., например, Hiatt et al., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko et al. (1995) *The Plant J.* 8: 745-750 и Fecker et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32: 979-986.

Размножение клеток позвоночных в культуре (культуре ткани) и экспрессия в них белков стали рутинной процедурой. Примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (C0S-7, ATCC CRL 1651); линия почки эмбриона человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки детеныша хомячка (BHK, ATCC CCL 10); Клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1, ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой маргынши (VERO-76, ATCC CRL1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени серой крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, 1413 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и линия клеток гепатомы человека (Hep G2).

При использовании рекомбинантных методов, ВСМА-связывающие антитела или их фрагменты, предложенные в настоящем документе, могут продуцироваться внутриклеточно, в периплазматическом

пространстве или прямо секретироваться в среду. Если связывающая молекула продуцируется внутриклеточно, на первом этапе частицы дебриса, будь то клетки-хозяева или лизированные фрагменты, удаляются, например, с помощью центрифугирования или ультрафильтрации. В статье Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) описана процедура выделения антител, которые секретированы в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточный осадок размораживается в присутствии ацетата натрия (рН 3,5), EDTA и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение примерно 30 мин. Остатки клеток можно удалить центрифугированием. Когда антитело секретировано в среду, супернатанты таких экспрессионных систем обычно сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрации белка, например, устройства для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеаз, такой как PMSF, может быть включен на любой из вышеуказанных стадий для ингибирования протеолиза, а антибиотики могут быть включены для предотвращения роста попавших микроорганизмов.

Антитела против ВСМА или их ВСМА-связывающие фрагменты, полученные из клеток-хозяев, могут быть очищены с использованием, например, хроматографии на гидроксилapatите, гелеэлектрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем предпочтительной методикой очистки является аффинная хроматография. Носитель, к которой присоединен аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, но доступны и другие носители. Механически стабильные носители, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокие скорости потока и более короткое время процедуры, по сравнению с теми, которые могут быть достигнуты с агарозой. Если связывающая молекула по настоящему изобретению содержит домен СН₃, для очистки можно использовать АВХМresin Bakerbond (JT Baker, Phillipsburg, NJ). В зависимости от антитела, подлежащего выделению, могут использоваться другие методы очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращеннофазовая ВЭЖХ, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарин-SEPHAROSE!!!, хроматография на анионной или катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусировка, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония в соответствии со стандартными процедурами.

В другом аспекте предложены способы получения связывающих молекул по настоящему изобретению, где указанные способы включают культивирование клетки-хозяина, определенной в данном документе, в условиях, позволяющих экспрессию связывающей молекулы, и выделение полученной связывающей молекулы из культуры.

Термин "культивирование" относится к поддержанию, дифференцировке, росту, пролиферации и/или размножению клеток *in vitro* в подходящих условиях в среде.

6.7. Способы применения.

В другом аспекте в настоящем документе предложены способы применения антител против ВСМА или их ВСМА-связывающих фрагментов, например способы лечения с использованием таких антител или фрагментов антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в настоящем документе предложен способ лечения субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, связанным с ВСМА, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества одного или нескольких антител против ВСМА или их ВСМА-связывающих фрагментов. В настоящем документе также предложен способ лечения субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, связанным с плазматическими клетками, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества одного или нескольких антител против ВСМА или их, ВСМА-связывающих фрагментов. В настоящем документе также предложен способ лечения субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, связанным с В-клетками, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества одного или нескольких антител против ВСМА или их ВСМА-связывающих фрагментов. В конкретных вариантах осуществления изобретения связанное с ВСМА заболевание представляет собой макроглобулинемию, амилоидоз, макроглобулинемию Вальденстрема, солитарную плазмцитому кости, экстрамедуллярную плазмцитому, остеосклеротическую миелому, заболевания тяжелых цепей, моноклональную гаммопатию неустановленного значения и тлеющую множественную миелому.

В настоящем документе также предложен способ подавления роста клеток множественной миеломы, включающий в себя контактирование клеток множественной миеломы с одним или несколькими антителами против ВСМА или их ВСМА-связывающими фрагментами, предложенными в настоящем документе. Кроме того, в настоящем документе предложен способ снижения скорости роста клеток множественной миеломы, включающий в себя контактирование клеток множественной миеломы с одним или несколькими антителами против ВСМА или их ВСМА-связывающими фрагментами, предложенными в настоящем документе.

В любом из способов, например, способов лечения, предложенных в настоящем документе, антитело или его ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой "голое" антитело или фрагмент, то есть антитело или фрагмент не модифицированы для включения токсичного фрагмента. В любом из способов, например, способов лечения, предложенных в настоящем документе, антитело или его ВСМА-связывающий фрагмент является частью конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), например

ADC, описанного в разделе 5.3 выше.

В любом из способов лечения, предложенных в настоящем документе, антитела против ВСМА или их ВСМА-связывающие фрагменты используются или вводятся в терапевтически эффективном количестве. В различных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество составляет от 1×10^5 до 5×10^5 , от 5×10^5 до 1×10^6 , от 1×10^6 до 5×10^6 , от 5×10^6 до 1×10^7 , от 1×10^7 до 5×10^7 , от 5×10^7 до 1×10^8 , от 1×10^8 до 5×10^8 , от 5×10^8 до 1×10^9 наномоль указанных антител или фрагментов. В различных других вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективное количество составляет от 1×10^5 до 5×10^5 , от 5×10^5 до 1×10^6 , от 1×10^6 до 5×10^6 , от 5×10^6 до 1×10^7 , от 1×10^7 до 5×10^7 , от 5×10^7 до 1×10^8 , от 1×10^8 до 5×10^8 , от 5×10^8 до 1×10^9 наномоль указанных антител или фрагментов.

Антитела против ВСМА или ВСМА-связывающие фрагменты могут вводиться пациенту, который в этом нуждается, по любой схеме введения, которую лечащие врачи или клиницисты сочтут подходящей, например, один раз каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней или один раз в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 недель. Антитела против ВСМА или их ВСМА-связывающие фрагменты можно вводить в течение определенного периода времени, например, 1, 2, 3 или 4 недель, с последующим отдыхом без введения антитела или фрагмента антитела. Такой цикл введения-отдыха может повторяться 2, 3, 4 или 5 раз.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент, которому вводят антитела против ВСМА или их ВСМА-связывающие фрагменты, ранее получал 1, 2, 3 или более линий терапии, причем предыдущие линии терапии могут включать введение одного или нескольких из следующих лекарственных средств: леналидомида (Ревлимида), помалидомида (Помалиста), талидомида (Таломида), бортезомиба (Велкада), дексаметазона, циклофосфамида, доксорубицина (Адриамина, Рубекса), карфилзомиба (Криполиса), иксазомиба (Нинларо), цисплатина (Платинола), доксорубицина (Адриамина), этопозид (Этопозид), антител против CD38, таких как даратумумаб (Дарзалекс); панобиностат или элутузумаб (Эмплисиг). В конкретных вариантах осуществления изобретения такие пациенты получали терапию бортезомибом, леналидомидом и дексаметазоном (RVD); бортезомибом, циклофосфамидом и дексаметазоном (BCD); бортезомибом, доксорубицином и дексаметазоном; карфилзомибом, леналидомидом и дексаметазоном (CRD); иксазомибом, леналидомидом и дексаметазоном; бортезомибом и дексаметазоном; бортезомибом, талидомидом и дексаметазоном; леналидомидом и дексаметазоном; дексаметазоном, талидомидом, цисплатином, доксорубицином, циклофосфамидом, этопозидом и бортезомибом (VTD-PACE); леналидомидом и дексаметазоном в низких дозах; бортезомибом, циклофосфамидом и дексаметазоном; карфилзомибом и дексаметазоном; только леналидомидом; только бортезомибом; только даратумумабом; бортезомибом, леналидомидом и дексаметазоном; даратумумабом, бортезомибом и дексаметазоном; даратумумабом, леналидомидом и дексаметазоном; элутузумабом, леналидомидом и дексаметазоном; элутузумабом, леналидомидом и дексаметазоном; бендамустином, бортезомибом и дексаметазоном; бендамустином, леналидомидом и дексаметазоном; помалидомидом и дексаметазоном; помалидомидом, бортезомибом и дексаметазоном; помалидомидом, карфилзомибом и дексаметазоном; бортезомибом и липосомальным доксорубицином; циклофосфамидом, леналидомидом и дексаметазоном; элутузумабом, бортезомибом и дексаметазоном; иксазомибом и дексаметазоном; панобиностатом, бортезомибом и дексаметазоном; панобиностатом и карфилзомибом; или помалидомидом, циклофосфамидом и дексаметазоном.

Введение антител против ВСМА или их ВСМА-связывающих фрагментов пациенту, нуждающемуся в этом, может сопровождаться одним или несколькими дополнительными методами лечения. Для некоторых видов рака, например множественной миеломы, одна или несколько дополнительных терапевтических схем могут включать в себя один или несколько из следующих препаратов: леналидомид, помалидомид, талидомид, бортезомиб, дексаметазон, циклофосфамид, доксорубицин, карфилзомиб, иксазомиб, цисплатин, доксорубицин, этопозид, анти-CD38 антитело, такое как даратумумаб, панобиностат и/или элутузумаб, по отдельности или в одной из комбинаций, перечисленных выше, или в любой другой комбинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациенту, нуждающемуся в этом, вводят одно или несколько антител против ВСМА, предложенных в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими соединениями, описанными в разделе 5.3 выше, например, в комбинации с леналидомидом или помалидомидом.

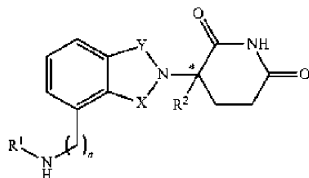
В некоторых других вариантах осуществления изобретения пациенту, нуждающемуся в этом, вводят одно или несколько антител против ВСМА, предложенных в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими из следующих соединений.

Примеры соединений включают, но не ограничиваются ими, N-[2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)метил]циклопропил-карбоксамид; 3-[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-4-илметил]-1,1-диметилмочевина; (-)-3-(3,4-диметоксифенил)-3-(1-оксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)пропионамид; (+)-3-(3,4-диметоксифенил)-3-(1-оксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)пропионамид; (-)-{2-[1-(3-этокси-4-метоксифенил)-2-метилсульфонилэтил]-4-ацетиламиноизоиндолин-1,3-дион}; (+)-{2-[1-(3-этокси-4-метоксифенил)-2-метилсульфонилэтил]-4-ацетиламиноизоиндолин-1,3-дион}; дифторметокси-SeqCID; 1-фталимидо-1-(3,4-диэтоксифенил)этан; 3-

(3,4-диметоксифенил)-3-(3,5-диметоксифенил)акрилонитрил; 1-оксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-аминоизоиндолин; 1,3-диоксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-аминоизоиндолин; 4-амино-2-(3-метил-2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндол-1,3-дион; 3-(3-ацетоамидофталимидо)-3-(3-этокси-4-метоксифенил)-N-гидроксипропионамид; 1-оксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-метилизоиндолин; циклопропил-N-{2-[(1S)-1-(3-этокси-4-метоксифенил)-2-(метилсульфонил)этил]-3-оксоизоиндолин-4-ил} карбоксамида; замещенный 2-(3-гидрокси-2,6-диоксопиперидин-5-ил)изоиндолин; N-[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-илметил]-4-трифторметоксибензамид; (S)-4-хлор-N-((2-(3-метил-2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-5-ил)метил)бензамид; пиперидин-2-карбоновая кислота[2-[(3S)-3-метил-2,6-диоксопиперидин-3-ил]-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-илметил]амид; (S)-N-((2-(3-метил-2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-5-ил)метил)-4-(трифторметил)бензамид; 3-(2,5-диметил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)пиперидин-2,6-дион и т.п.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациенту, нуждающемуся в этом, вводят одно или несколько антител против ВСМА, предложенных в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими циано- и карбокси-производными замещенных стиролов, такими как те, что раскрыты в патенте США № 5929117; 1-оксо-2-(2,6-диоксо-3-фторпиперидин-3-ил)изоиндолинами и 1,3-диоксо-2-(2,6-диоксо-3-фторпиперидин-3-ил)изоиндолинами, такими как описанные в патентах США №№ 5874448 и 5955476; 1-оксо- и 1,3-диоксоизоиндолинами, замещенными в 4-м или 5-м положении индолинового кольца (например, 4-(4-амино-1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)-4-карбамоилбутановая кислота), описанными в патенте США № 6380239; изоиндолин-1-оном и изоиндолин-1,3-дионом, замещенными во 2-м положении 2,6-диоксо-3-гидрокси-пиперидин-5-илом (например, 2-(2,6-диоксо-3-гидрокси-5-фторпиперидин-5-ил)-4-аминоизоиндолин-1-он), описанный в патенте США № 6458810; представителями класса неполипептидных циклических амидов, раскрытых в патентах США №№ 5698579 и 5877200; и изоиндолеимидными соединениями, такими как описанные в публикации патента США № 2003/0045552, публикации патента США № 2003/0096841 и международной заявке № PCT/US01/50401 (международная публикация № WO 02/059106). В публикации патента США № 2006/0205787 описаны композиции 4-амино-2-(3-метил-2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндол-1,3-диона. В публикации патента США № 2007/0049618 описаны изоиндолеимидные соединения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациенту, нуждающемуся в этом, вводят одно или несколько антител против ВСМА, предложенных в настоящем документе, в сочетании с одним или несколькими представителями класса изоиндолеимидов, раскрытых в патенте США № 7091353, публикации патента США № 2003/0045552 и международной заявке № PCT/US01/50401 (международная публикация № WO 02/059106), каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки. Типичные соединения имеют формулу II:



и их фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты, клатраты, энантиомеры, диастереомеры, рацематы и смеси стереоизомеров, где: один из X и Y представляет собой C=O, а другой представляет собой CH₂ или C=O; R¹ представляет собой H, (C₁-C₈)алкил, (C₃-C₇)циклоалкил, (C₂-C₈)алкенил, (C₂-C₈)алкинил, бензил, арил, (C₀-C₄)алкил-(C₁-C₆)гетероциклоалкил, (C₀-C₄)алкил-(C₂-C₅)гетероарил, C(O)R³, C(S)R³, C(O)OR⁴, (C₁-C₈)алкил-N(R⁶)₂, (C₁-C₈)алкил-OR⁵, (C₁-C₈)алкил-C(O)ORS, C(O)NHR³, C(S)NHR³, C(O)NR³R³¹, C(S)NR³R³¹ или (C₁-C₈)алкил-O(CO)R⁵; R² представляет собой H, F, бензил, (C₁-C₈)алкил, (C₂-C₈)алкенил или (C₂-C₈)алкинил; R³ и R³¹ представляют собой независимо (C₁-C₈)алкил, (C₃-C₇)циклоалкил, (C₂-C₈)алкенил, (C₂-C₅)алкинил, бензил, арил, (C₀-C₄)алкил-(C₁-C₆)гетероциклоалкил, (C₀-C₄)алкил-(C₂-C₅)гетероарил, (C₀-C₈)алкил-N(R⁶)₂, (C₁-C₈)алкил-OR⁵, (C₁-C₈)алкил-C(O)OR⁵, (C₁-C₈)алкил-O(CO)R⁵ или C(O)OR⁵; R⁴ представляет собой (C₁-C₈)алкил, (C₂-C₈)алкенил, (C₂-C₈)алкинил, (C₁-C₄)алкил-OR⁵, бензил, арил, (C₀-C₄)алкил-(C₁-C₆)гетероциклоалкил или (C₀-C₄)алкил-(C₂-C₅)гетероарил; R⁵ представляет собой (C₁-C₈)алкил, (C₂-C₈)алкенил, (C₂-C₈)алкинил, бензил, арил, (C₂-C₅)гетероарил; во всех случаях R⁶ представляет собой независимо H, (C₁-C₈)алкил, (C₂-C₈)алкенил, (C₂-C₈)алкинил, бензил, арил, (C₂-C₅)гетероарил или (C₀-C₈)алкил-C(O)O-R⁵, или группы R⁶ могут соединяться с образованием гетероциклоалкильной группы;

n имеет значение 0 или 1; и

* представляет собой хиральный углеродный центр.

В конкретных соединениях по формуле II, когда n имеет значение 0, тогда R¹ представляет собой (C₃-C₇)циклоалкил, (C₂-C₈)алкенил, (C₂-C₈)алкинил, бензил, арил, (C₀-C₄)алкил-(C₁-C₆)гетероциклоалкил, (C₀-C₄)алкил-(C₂-C₅)гетероарил, C(O)R³, C(O)OR⁴, (C₁-C₈)алкил-N(R⁶)₂, (C₁-C₈)алкил-OR⁵, (C₁-C₈)алкил-C(O)OR⁵, C(S)NHR³ или (C₁-C₈)алкил-O(CO)R⁵;

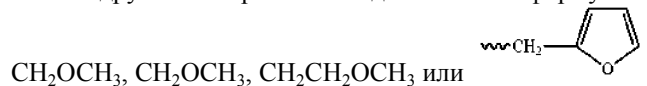
R² представляет собой H или (C₁-C₈)алкил; и R³ представляет собой (C₁-C₈)алкил, (C₃-

C_7)циклоалкил, (C_2-C_8) алкенил, (C_2-C_8) алкинил, бензил, арил, (C_0-C_4) алкил- (C_1-C_6) гетероциклоалкил, (C_0-C_4) алкил- (C_2-C_5) гетероарил, (C_5-C_8) алкил- $N(R^6)_2$; (C_0-C_8) алкил- $NH-C(O)O-R^5$; (C_1-C_8) алкил- OR^5 , (C_1-C_8) алкил- $C(O)OR^5$, (C_1-C_8) алкил- $O(CO)R^5$ или $C(O)OR^5$; и другие переменные имеют такие же определения.

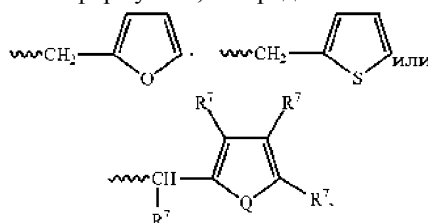
В других конкретных соединениях по формуле II R^2 представляет собой H или (C_1-C_4) алкил.

В других конкретных соединениях по формуле II R^1 представляет собой (C_1-C_8) алкил или бензил.

В других конкретных соединениях по формуле II R^1 представляет собой H, (C_1-C_8) алкил, бензил,



В другом варианте соединений по формуле II, R^1 представляет собой



где Q представляет собой O или S, и в каждом случае R^7 независимо представляет собой H, (C_1-C_8) алкил, (C_3-C_7) циклоалкил, (C_2-C_8) алкенил, (C_2-C_8) алкинил, бензил, арил, галоген, (C_0-C_4) алкил- (C_1-C_6) гетероциклоалкил, (C_0-C_4) алкил- (C_2-C_5) гетероарил, (C_0-C_8) алкил- $N(R^6)_2$, (C_1-C_8) алкил- OR^5 , (C_1-C_8) алкил- $C(O)OR^5$, (C_1-C_8) алкил- $O(CO)R^5$ или $C(O)OR^5$, или соседние R^7 могут быть объединены с образованием бициклического алкильного или арильного кольца.

В других конкретных соединениях по формуле II R^1 представляет собой $C(O)R_3$.

В других конкретных соединений формулы II, R^3 представляет собой (C_0-C_4) алкил- (C_2-C_5) гетероарил, (C_1-C_8) алкил, арил или (C_0-C_4) алкил- OR^5 .

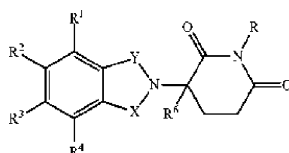
В других конкретных соединениях по формуле II гетероарил представляет собой пиридил, фурил или тиенил.

В других конкретных соединениях по формуле II R^1 представляет собой $C(O)OR^4$.

В других конкретных соединениях по формуле II H в $C(O)NHC(O)$ может быть заменен (C_1-C_4) алкилом, арилом или бензилом.

Дополнительные примеры соединений этого класса включают, но не ограничиваются ими: [2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-4-илметил]амид; трет-бутиловыйэфир(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-4-илметил)карбаминовой кислоты; 4-(аминометил)-2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)изоиндолин-1,3-дион; N-(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-4-илметил)ацетамид; N-(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)метил} циклопропилкарбоксамид; 2-хлор-N-{2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)метил}ацетамид; N-(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)-3-пиридилкарбоксамид; 3-{1-оксо-4-(бензиламино)изоиндолин-2-ил}пиперидин-2,6-дион; 2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-4-(бензиламино)изоиндолин-1,3-дион; N-{2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)метил}пропанамид; N-{2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)метил}-3-пиридилкарбоксамид; N-{2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)метил}гептанамид; N-{2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)метил}-2-фурилкарбоксамид; (N-(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)карбамоил} метилацетат; N-(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)пентанамид; N-(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)-2-тиенилкарбоксамид; N-{2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил]метил}(бутиламин)карбоксамид; N-{2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил]метил}(октиламино)карбоксамид; и N-{2-(2,6-диоксо(3-пиперидил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил]метил}(бензиламино)карбоксамид.

В некоторых других вариантах осуществления изобретения пациенту, нуждающемуся в этом, вводят одно или несколько антител против ВСМА, предложенных в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими представителями класса изоиндолиминов, раскрытых в публикации патентной заявки США № US 2002/0045643, международной публикации № WO 98/54170 и патенте США № 6395754, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки. Типичные соединения имеют формулу III:



и их фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты, клатраты, энантиомеры, диастереомеры, рацематы и смеси стереоизомеров, где: один из X и Y представляет собой $C=O$, а другой представля-

ет собой CH_2 или $\text{C}=\text{O}$;

R представляет собой H или $\text{CH}_2\text{OCOR}'$;

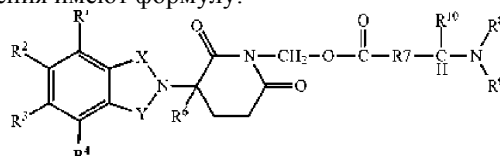
(i) каждый из R^1 , R^2 , R^3 или R^4 , независимо от других, представляет собой галоген, алкил с 1-4 атомами углерода или алкоксигруппу с 1-4 атомами углерода, или (ii) один из R^1 , R^2 , R^3 или R^4 представляет собой нитрогруппу или $-\text{NHR}_5$, а оставшиеся из R^1 , R^2 , R^3 или R^4 представляют собой водород; R^5 представляет собой водород или алкил с 1-8 атомами углерода, R^6 представляет собой водород, алкил с 1-8 атомами углерода, бензо, хлор или фтор;

R^1 представляет собой $\text{R}^7-\text{CHR}^{10}-\text{N}(\text{R}^8\text{R}^9)$;

R^7 представляет собой м-фенилен или п-фенилен или $-(\text{C}_n\text{H}_{2n})-$, в которой n имеет значение от 0 до 4; каждый из R^8 и R^9 , независимо друг от друга, представляет собой водород или алкил, содержащий от 1 до 8 атомов углерода, или R^8 и R^9 , взятые вместе, представляют собой тетраметилен, пентаметилен, гексаметилен или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}_1\text{CH}_2\text{CH}_2-$, в которой X_1 представляет собой $-\text{O}-$, $-\text{S}-$ или $-\text{NH}-$; R^{10} представляет собой водород, алкил с 8 атомами углерода или фенил; и

* представляет собой хиральный углеродный центр.

Другие типичные соединения имеют формулу:



где: один из X и Y представляет собой $\text{C}=\text{O}$, а другой из X и Y представляет собой $\text{C}=\text{O}$ или CH_2 ;

(i) каждый из R^1 , R^2 , R^3 или R^4 , независимо от других, представляет собой галоген, алкил с 1-4 атомами углерода или алкоксигруппу с 1-4 атомами углерода, или (ii) один из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 представляет собой $-\text{NHR}_5$, а оставшиеся из R^1 , R^2 , R^3 или R^4 представляют собой водород;

R^5 представляет собой водород или алкил с 1-8 атомами углерода;

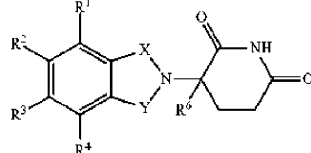
R^6 представляет собой водород, алкил с 1-8 атомами углерода, бензо, хлор или фтор;

R^7 представляет собой м-фенилен или п-фенилен или $-(\text{C}_n\text{H}_{2n})-$, в которой n имеет значение от 0 до 4;

каждый из R^8 и R^9 , независимо друг от друга, представляет собой водород или алкил, содержащий от 1 до 8 атомов углерода, или R^8 и R^9 , взятые вместе, представляют собой тетраметилен, пентаметилен, гексаметилен или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}_1\text{CH}_2\text{CH}_2-$, в которой X_1 представляет собой $-\text{O}-$, $-\text{S}-$ или $-\text{NH}-$; и

R^{10} представляет собой водород, алкил до 8 атомов углерода или фенил.

Другие типичные соединения имеют формулу:

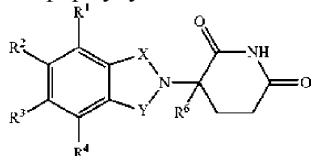


в которой один из X и Y представляет собой $\text{C}=\text{O}$, а другой из X и Y представляет собой $\text{C}=\text{O}$ или CH_2 ;

каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 , независимо от других, представляет собой галоген, алкил с 1-4 атомами углерода или алкоксигруппу с 1-4 атомами углерода или (ii) один из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 представляет собой нитрогруппу или защищенную аминогруппу, а оставшиеся из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 представляют собой водород; и

R^6 представляет собой водород, алкил с 1-8 атомами углерода, бензо, хлор или фтор.

Другие типичные соединения имеют формулу:



в которой: один из X и Y представляет собой $\text{C}=\text{O}$, а другой из X и Y представляет собой $\text{C}=\text{O}$ или CH_2 ;

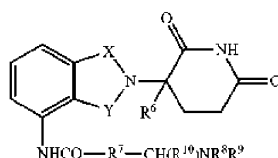
(i) каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 , независимо от других, представляет собой галоген, алкил с 1-4 атомами углерода или алкоксигруппу с 1-4 атомами углерода, или (ii) один из

R^1 , R^2 , R^3 и R^4 представляет собой $-\text{NHR}_5$, а оставшиеся из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 представляют собой водород;

R^5 представляет собой водород, алкил с 1-8 атомами углерода или $\text{CO}-\text{R}^7-\text{CH}(\text{R}^{10})\text{NR}^8\text{R}^9$, в которой каждый из R^7 , R^8 , R^9 и R^{10} имеет значения, указанные в данном документе; и

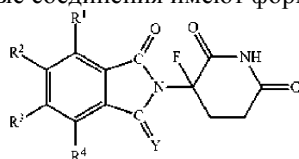
R^6 представляет собой алкил с 1-8 атомами углерода, бензо, хлор или фтор.

Конкретные примеры соединений имеют формулу



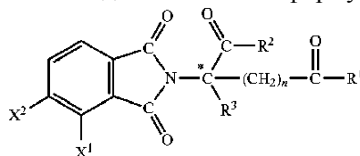
один из X и Y представляет собой C=O, а другой из X и Y представляет собой C=O или CH₂;
 R⁶ представляет собой алкил с 1-8 атомами углерода, бензил, хлор или фтор;
 R⁷ представляет собой м-фенилен, п-фенилен или -(C_nH_{2n})-, в которой n имеет значение от 0 до 4;
 каждый из R⁸ и R⁹, независимо друг от друга, представляет собой водород или алкил, содержащий от 1 до 8 атомов углерода, или R⁸ и R⁹, взятые вместе, представляют собой тетраметилен, пентаметилен, гексаметилен или -CH₂CH₂X₁CH₂CH₂-, в которой X₁ представляет собой -O-, -S- или -NH-; и
 R¹⁰ представляет собой водород, алкил с 1-8 атомами углерода или фенил.

Другими специфичными иммуномодулирующими соединениями являются 1-оксо-2-(2,6-диоксо-3-фторпиперидин-3-ил)изоиндолины и 1,3-диоксо-2-(2,6-диоксо-3-фторпиперидин-3-ил)изоиндолины, такие как описанные в патентах США №№ 5874448 и 5955476, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки. Типичные соединения имеют формулу:



где: Y представляет собой кислород или H₂, и каждый из R¹, R², R³ и R⁴, независимо от других, представляет собой водород, галоген, алкил с 1-4 атомами углерода, алкоксигруппу с 1-4 атомами углерода или аминогруппу.

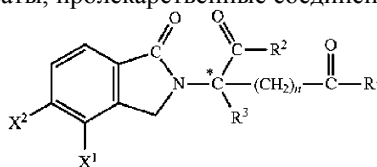
Другими специфичными иммуномодулирующими соединениями, раскрытыми в данном документе, являются 1-оксо- и 1,3-диоксоизоиндолины, замещенные в 4-м или 5-м положении индолинового кольца, описанные в патенте США № 6380239 и патенте США № 7244759, которые оба включены в настоящий документ посредством ссылки. Типичные соединения имеют формулу:

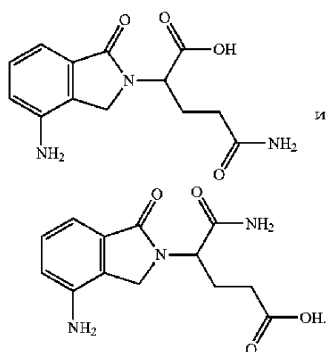


в которой атом углерода, обозначенный C*, представляет собой хиральный центр (когда n не равно нулю, и R¹ не является тем же, что и R²); один из X¹ и X² представляет собой аминогруппу, нитрогруппу, алкил с числом атомов углерода от одного до шести или NH-Z, а другой из X¹ или X² представляет собой водород; каждый из R¹ и R², независимо от другого, представляет собой гидроксигруппу или NH-Z; R³ представляет собой водород, алкил с числом атомов углерода от одного до шести, галоген или галогеналкил; Z представляет собой водород, арил, алкил с числом атомов углерода от одного до шести, формил или ацил с числом атомов углерода от одного до шести; и n имеет значение 0, 1 или 2; при условии, что если X¹ представляет собой аминогруппу, а n имеет значение 1 или 2, тогда R¹ и R², оба не являются гидроксильной группой; и их соли.

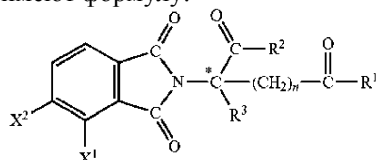
Другие типичные соединения имеют формулу: в которой атом углерода, обозначенный C*, представляет собой хиральный центр, когда n не равно нулю, и R¹ не является R²; один из X¹ и X² представляет собой аминогруппу, нитрогруппу, алкил с числом атомов углерода от одного до шести или NH-Z, а другой из X¹ или X² представляет собой водород; каждый из R¹ и R², независимо от другого, представляет собой гидроксигруппу или NH-Z; R³ представляет собой алкил с числом атомов углерода от одного до шести, галоген или водород; Z представляет собой водород, арил или алкил или ацил с числом атомов углерода от одного до шести; и n имеет значение 0, 1 или 2.

Конкретные примеры включают, но не ограничиваются ими, 2-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)-4-карбамоилмасляную кислоту и 4-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)-4-карбамоилмасляную кислоту, которые имеют нижеследующие структуры, соответственно, и их фармацевтически приемлемые соли, сольваты, пролекарственные соединения и стереоизомеры:



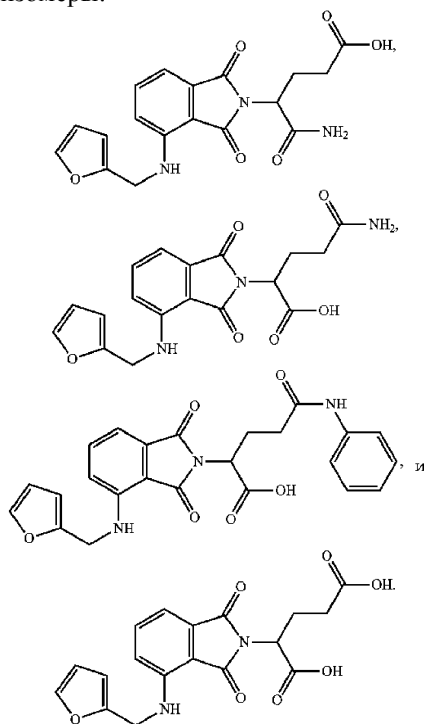


Другие типичные соединения имеют формулу:

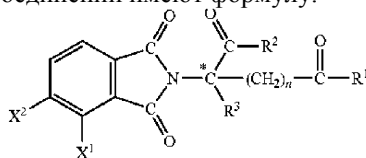


в которой атом углерода, обозначенный C*, представляет собой хиральный центр, когда n не равно нулю, и R¹ не является R²; один из X¹ и X² представляет собой аминогруппу, нитрогруппу, алкил с числом атомов углерода от одного до шести или NH-Z, а другой из X¹ или X² представляет собой водород; каждый из R¹ и R², независимо от другого, представляет собой гидроксигруппу или NH-Z; R³ представляет собой алкил с числом атомов углерода от одного до шести, галоген или водород; Z представляет собой водород, арил или алкил или ацил с числом атомов углерода от одного до шести; и n имеет значение 0, 1 или 2; и их соли.

Конкретные примеры включают, но не ограничиваются ими, 4-карбамоил-4-{4-[(фуран-2-илметил)амино]-1,3-диоксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил}масляную кислоту, 4-карбамоил-2-{4-[(фуран-2-илметил)амино]-1,3-диоксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил}масляную кислоту, 2-{4-[(фуран-2-илметил)амино]-1,3-диоксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил}-4-п-генилкарбамоил-масляную кислоту и 2-{4-[(фуран-2-илметил)амино]-1,3-диоксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил}пентандионовую кислоту, которые имеют нижеследующие структуры, соответственно, и их фармацевтически приемлемые соли, сольваты, пролекарственные соединения и стереоизомеры:



Другие конкретные примеры соединений имеют формулу:



в которой: один из X^1 и X^2 представляет собой нитро или NH-Z, а другой из X^1 или X^2 представляет собой водород;

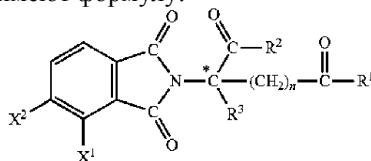
каждый из R^1 и R^2 , независимо от другого, представляет собой гидроксигруппу или NH-Z;

R^3 представляет собой алкил с числом атомов углерода от одного до шести, галоген или водород;

Z представляет собой водород, фенил, ацил с числом атомов углерода от одного до шести или алкил с числом атомов углерода от одного до шести; и n имеет значение 0, 1 или 2; и

если $-COR^2$ и $-(CH_2)_nCOR^1$ различны, атом углерода, обозначенный C^* , представляет собой хиральный центр.

Другие типичные соединения имеют формулу:



в которой: один из X^1 и X^2 представляет собой алкил, содержащий от одного до шести атомов углерода;

каждый из R^1 и R^2 , независимо от другого, представляет собой гидроксигруппу или NH-Z;

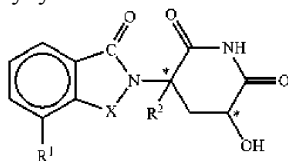
R^3 представляет собой алкил с числом атомов углерода от одного до шести, галоген или водород;

Z представляет собой водород, фенил, ацил с числом атомов углерода от одного до шести или алкил с числом атомов углерода от одного до шести; и n имеет значение 0, 1 или 2; и

если $-COR^2$ и $-(CH_2)_nCOR^1$ различны, атом углерода, обозначенный C^* , представляет собой хиральный центр.

Еще одними специфичными иммуномодулирующими соединениями являются изоиндолин-1-он и изоиндолин-1,3-дион, замещенные во 2-м положении 2,6-диоксо-3-гидрокси-пиперидин-5-илом, описанные в патенте США № 6458810, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Типичные соединения имеют формулу:



в которой: атомы углерода, обозначенные *, представляют собой хиральные центры; X представляет собой -C(O)- или $-CH_2-$;

R^1 представляет собой алкил с 1-8 атомами углерода или $-NHR^3$;

R^2 представляет собой водород, алкил с 1-8 атомами углерода или галоген; и

R^3 представляет собой водород, алкил с 1-8 атомами углерода, незамещенную или замещенную алкоксигруппу с 1-8 атомами углерода, галоген, amino- или алкиламиногруппу с 1-4 атомами углерода, циклоалкил с 3-18 атомами углерода, фенил, незамещенный или замещенный алкилом с 1-8 атомами углерода, алкоксигруппой с 1-8 атомами углерода, галогеном, amino- или алкиламиногруппой с 1-4 атомами углерода, бензил, незамещенный или замещенный алкилом с 1-8 атомами углерода, алкоксигруппой с 1-8 атомами углерода, галогеном, amino- или алкиламиногруппой с 1-4 атомами углерода или $-COR^4$, в которой R^4 представляет собой водород, алкил с 1-8 атомами углерода, незамещенный или замещенный алкоксигруппой с 1-8 атомами углерода, галогеном, amino- или алкиламиногруппой с 1-4 атомами углерода, циклоалкил с 3-18 атомами углерода, фенил, незамещенный или замещенный алкилом с 1-8 атомами углерода, алкоксигруппой с 1-8 атомами углерода, галогеном, amino- или алкиламиногруппой с 1-4 атомами углерода, или бензил, незамещенный или замещенный алкилом с 1-8 атомами углерода, алкоксигруппой с 1-8 атомами углерода, галогеном, amino- или алкиламиногруппой с 1-4 атомами углерода.

7. Примеры

В экспериментах, описанных в примерах 1-3, использовали следующие материалы и способы.

Культивирование клеток: клетки Hek293 выращивали в среде DMEM (ThermoFisher) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Клетки С6 культивировали на питательной смеси Ham's F12 (ThermoFisher) с добавлением 10% FBS. Клетки NCIH929, U266B1, KMS12BM, OPM2 и NUDHL1 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS.

Плазмиды: кДНК, кодирующую полноразмерный ВСМА человека (UniProtKB-Q02223; TNFRSF17) клонировали в экспрессионный вектор SF#10008 и трансфицировали в клетки С6. Полноразмерную кДНК, кодирующую TNFRSF12A человека (TWEAKR; NP_057723.1), субклонировали в экспрессионный вектор pCDNA3.1 (+), который впоследствии трансфицировали в клетки Hek293. Трансфектанты были отобраны с использованием пурамицина или неомицина, и клональные популяции были созданы и проанализированы с помощью проточной цитометрии.

FACS-анализ: FACS-антитела, используемые в этом исследовании, включают: 1) LS-C106982-100, мышинное моноклональное антитело против TNFRSF12A человека, конъюгированное с R-фикоэритрином

(PE) (LifeSpan BioSciences, Inc.); 2) EM901, которое ранее было охарактеризовано как ВСМА-связывающее антитело (Mab42; номер международной заявки WO2017/021450); 3) специфичное к Fc γ IgG человека от компании Ebiosciences, меченное PE; 4) контроль изотипа IgG человека; 5) анти-TAC1 антитело [1A1] (Abcam); 6) антитело к рецептору BAFF 8A7 (ThermoFisher); 7) анти-ВСМА антитело 19F2 (BioLegend). Каждый тип клеток (75000 клеток/лунку) инкубировали с первичными антителами в буфере для FACS (PBS, содержащий 0,2% BSA) в течение 25 мин в 96-луночном планшете. Клетки промывали один раз буфером для FACS и инкубировали с вторичным антителом в разведении 1:100 в течение 25 мин. После однократной промывки клетки фиксировали в течение 10 мин 1%-м параформальдегидом, промывали буфером для FACS и ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS. Меченые клетки анализировали с использованием проточного цитометра Attune NxT, а данные обрабатывали с помощью FlowJo 10.0.8rl (FLOWJO LLC) в соответствии с инструкциями производителя.

7.1. Пример 1.

Антиген созревания В-клеток (BCMA), также известный как член суперсемейства 17 рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF17), представляет собой белок, который найден при многих различных типах рака.

Получение антител против BCMA: антитела против BCMA человека были получены в результате иммунизации животных OmniFlic (Ligand Pharmaceuticals)× RAT5Lew, проведенной в Aldevron Freiburg (Фрайбург, Германия) с многократным применением вектора ДНК, содержащего BCMA-(ак 1-54) и рекомбинантный внеклеточный домен BCMA человека (ак 1-54), приобретенный в AcroBiosystem (Ньюарк, Делавер, 19711). Собирали лимфатические узлы от иммунореактивных животных, и общую РНК экстрагировали из первичных лимфоцитов в Teneobio, Inc. (Пало-Альто, Калифорния). Вариабельные области IgG были амплифицированы в каждом образце перед проведением парноконцевого секвенирования следующего поколения с последующим ранговым анализом для количественного определения уровня экспрессии для каждой уникальной вариабельной области IgG человека.

Экспрессия антител против BCMA: ранее описанные пять V_H-областей вместе с панелью предполагаемых BCMA-реактивных V_H были котрансфицированы с одной общей V_L в стандартном формате антител IgG1/карпа. Все последовательности антител были субклонированы в вектор pTT5 для экспрессии белков млекопитающих (NRC-CNRC, Оттава, Онтарио, Канада). Антитела транзистентно трансфицировали в клетки Expi293 или ExpiCHO-S (Thermo Fisher Scientific, Уолтам, Массачусетс) в 24-глубоколуночных планшетах (кат. № P-DW-10ML-24-CS, Axugen, Тьюксбери, Массачусетс) в соответствии с протоколами производителя. Для каждого антитела соотношение ДНК для LC:HC 1:1 использовали для экспрессии при 0,5 мкг/мл ДНК/мл экспрессионной среды, и культуры встряхивали при 500 об/мин, используя 3-мм орбитальную платформу для встряхивания при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через шесть-семь дней после трансфекции среду в планшетах осветляли центрифугированием (3724 RCF, 4°C, 30 мин), и супернатанты переносили в новые многолуночные планшеты, предназначенные для определения титра с использованием биосенсоров на белке А на устройстве Octet Red 384 (Pall ForteBio, Фримонт, Калифорния) и проводили скрининг на активность.

После идентификации супернатантов, дающих положительный ответ, потенциальные анти-BCMA молекулы были транзистентно трансфицированы в клетки ExpiCHO-S в объеме 60 мл в колбах Эрленмейера на 250 мл (кат. №: 431144, Corning, Тьюксбери, Массачусетс) в соответствии с инструкциями производителя и встряхивали при 37°C и 120 об/мин на встряхиваемой платформе с орбитой 25 мм. После одной недели культивирования супернатанты собирали центрифугированием (3724 RCF, 4°C, 30 мин) с последующей фильтрацией (кат. № 89220-720, VWR, Реднор, Пенсильвания) и затем очищали.

Очистка анти-BCMA антител: отфильтрованные супернатанты очищали с использованием 5 мл смолы Mab Select Sure Lx (кат. № 29157185, GE Healthcare) на хроматографической системе АКТА Pure (кат. № 29046694, GE Healthcare). Эти образцы элюировали с колонки, используя цитрат натрия, pH 3,0, и нейтрализовали до pH 5,5 с помощью 3M Tris-HCl. Конечные образцы диализовали в лабораторный универсальный буфер (10 mM ацетат натрия, pH 5,2 и 9 мас./об.% сахарозы). Концентрацию и чистоту (оценка агрегации) измеряли с использованием SEC-колонки (кат. № PL 1580-3301, Agilent, США).

Анализ связывания для анти-BCMA антител методом поверхностного плазмонного резонанса: рабочий буфер, используемый в этом анализе, представлял собой HBS-EP (150 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 7,4, 3 mM EDTA и 0,005% поверхностно-активного вещества P20). Для невидных измерений, антитела 320199 и 319883 были иммобилизованы на чипе с белком А (GE Healthcare) в концентрации 2 мкг/мл, в то время как рекомбинантный Hu-BCMA (BCMA человека) от Acro Biosystems (BCA-H522y), а также Суно-BCMA (BCMA яванского макака) с отщепленным Fc пропускали над ними, начиная с максимальной концентрации 50 нМ с последующими 3-кратными разбавлениями до 0,6 нМ (50, 16,66, 5,55, 1,85, 0,6 и 0 нМ). Анализ проводили при 25°C и 37°C и скорости потока 10 мкл.

Шесть анти-BCMA клонов от Teneobio (320199, 319883, 319952, 320262, 319966, 320111) были протестированы на связывание с Human-BCMA (человека), Суно-BCMA (яванского макака) и Суно-TAC1 (взаимодействующий с CAML трансмембранный активаторный белок яванского макака), экспрессированных в клетках 293 с мышинным Fc-тегом, с использованием прибора Biacore-8K (GE Healthcare). Были

проведены измерения avidности (фиг. 1А) и неavidности (фиг. 1В).

Для измерения avidности антигены захватывали на поверхности, способной связываться с мышиными антителами, в концентрации 2 мкг/мл, в то время как антитела пропускали с начальной максимальной концентрацией 50 нМ с последующими 3-кратными разбавлениями до 0,6 нМ (50, 16,66, 5,55, 1,85, 0,6 и 0 нМ). Анализы проводили при 25°C и скорости потока 10 мкл/мин для захвата, 30 мкл/мин в течение 3 мин для ассоциации и 5 мин для диссоциации. Поверхность регенерировали после каждого цикла с помощью 10 мМ глицина, pH 1,5, в течение 1 мин. В качестве рабочего буфера, используемого в этом анализе, был взят HBS-EP (150 мМ NaCl, 10 мМ Hepes pH 7,4, 3 мМ EDTA и 0,005% поверхностно-активного вещества P20).

Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Biacore 8K Analysis (GE Healthcare), рассматривая данные с двойными контролями и используя модель Ленгмюра 1:1 для аппроксимации кривой. Анти-BCMA антитело от EngMab использовали в качестве положительного контроля, а антитело против RSV1-IgG1 использовали в качестве отрицательного контроля.

Иммуногистохимия: одноцветное иммуногистохимическое окрашивание (ИНС) с использованием DAB связывающих молекул в каркасе IgG человека или кролика с нормальными IgG человека и кролика (Abcam, ab172730) в качестве контролей изотипа выполняли на Bond-III Autostainer (Leica Microsystems) с набором Bond polymer refine detection (Leica, DS9800). В фиксированных формалином, залитых парафином (FFPE) срезах (4 мкм) клеточного осадка демаскировали антиген с помощью раствора 1 для извлечения эпитопов (Leica, AR9961) в течение 20 мин при 100°C и блокировали пероксидным блокирующим агентом в течение 5 мин. Срезы инкубировали со связывающими агентами при соответствующих разведениях в течение 15 мин. Для связывающих агентов в каркасе IgG человека использовали вторичное кроличье антитело против IgG человека (Abcam, ab2410, 1:100) на 8 мин. Этот шаг не требовался для связывающих агентов в каркасе кроличьего IgG. Затем срезы инкубировали в полимере в течение 8 мин, проявляли в DAB в течение 10 мин, окрашивали гематоксилином в течение 5 мин, покрывали покровным стеклом Sakura Finetek.

7.2. Исследования связывания анти-BCMA антител. Пример 2.

Этот пример демонстрирует, что IgG человека, 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199, распознают клетки С6, экспрессирующие белок BCMA человека. Клетки С6, стабильно трансфицированные BCMA человека или ложно-трансфицированные клетки С6, инкубировали с 0,4 мкг/мл EM901, 320262, 319966, 320111, 319883 или 320199. Реактивность каждого антитела контролировали с помощью FACS. EM901, антитело, для которого ранее было показано связывание с BCMA (номер патента WO 2017021450), хорошо связывало трансфектантов С6-BCMA, подтверждая экспрессию BCMA этими клетками. По сравнению с нетрансфицированными клетками С6 (левая гистограмма (синяя) кривая в каждой панели), гистограммы, соответствующие номерам 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199 (правая гистограмма (красная) кривая в каждой панели), показали существенные сдвиги вправо (фигура 2). Эти результаты показывают, что 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199 реагируют с человеческим BCMA, экспрессируемым на клеточной поверхности. Включены геометрические средние значения, количественно описывающие это связывание (фиг. 2).

7.3. Исследования связывания анти-BCMA антител. Пример 3.

Этот пример показывает, что 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199 не связывают клетки Нек293, экспрессирующие полноразмерный человеческий TNFRSF12A/TWEAKR, член семейства TNF-рецепторов, родственных BCMA. Клетки Нек293 стабильно трансфицированные человеческим TNFRSF12A, инкубировали с 0,4 мкг/мл контроля изотипа IgG человека, 320262, 319966, 320111, 319883 или 320199. Реактивность каждого антитела контролировали с помощью FACS. Клетки Нек293-TNFRSF12A, окрашенные антителом против TNFRSF12A, свидетельствуют об экспрессии TNFRSF12A. Относительно контроля изотипа (синяя гистограмма) сдвиги вправо гистограмм, соответствующих номерам 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199 (показаны красным), обнаружить не удалось (фиг. 3). Эти результаты показывают, что 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199 не проявляли значительной связывающей активности в отношении TNFRSF12A человека. Показаны геометрические средние для количественной оценки этого связывания (фиг. 3).

7.4. Исследования связывания анти-BCMA антител. Пример 4.

Этот пример демонстрирует, что 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199 распознают клетки множественной миеломы NCIH929, которые эндогенно экспрессируют BCMA человека. Клетки NCIH929 инкубировали с 1,0 мкг/мл контроля изотипа IgG человека, EM901, 320262, 319966, 320111, 319883 или 320199. Реактивность каждого антитела контролировали с помощью FACS. Антитело EM901, распознающее BCMA, прочно связывается с клетками NCIH929. Относительно контроля изотипа (левая гистограмма (синяя) кривая в каждой панели) гистограммы, соответствующие номерам 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199 (правая гистограмма (красная) кривая в каждой панели), показали существенные сдвиги вправо (фиг. 4). Эти результаты показывают, что 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199 взаимодействовали с клетками NCIH929. Показаны геометрические средние для количественной оценки этого связывания (фиг. 4).

7.5 Исследования связывания анти-BCMA антител. Пример 5.

Этот пример демонстрирует, что 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199 распознают клетки множественной миеломы BCMA⁺, U266B1 и KMS12BM, инкубированные с 0,016-10 мкг/мл контроля изотипа IgG человека, EM901, фигуре 5. Реактивность каждого антитела контролировали с помощью FACS. EM901, 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199 связывали U266B1 и KMS12BM относительно контроля изотипа дозозависимым образом (фиг. 5). Кроме того, 320262 и 320111 распознали клетки множественной миеломы OPM2, которые экспрессируют BCMA, но не TACI или BAFF рецептор, другие члены семейства TNF-рецепторов, родственные BCMA (кривая доза-ответ и гистограмма, фиг. 5). Напротив, 320262 и 320111 не связывают клетки NUDHL1, которые являются BCMA⁻/TACI⁺/BAFFR⁺ (кривая доза-ответ и гистограмма, фиг. 5). Эти результаты показывают, что 320262, 319966, 320111, 319883 и 320199 проявляют BCMA-зависимое, дозозависимое связывание с клетками. Показаны геометрические средние для количественной оценки этого связывания (фиг. 5).

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	Общая легкая цепь VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVVYQCQYNNWPWTFGQGTKVEIK
2	сLC CDR1 (по Кабату, Чотии, IMGT)	RASQSVSSNLA
3	сLC CDR2 (по Кабату, Чотии, IMGT)	GASTRAT
4	сLC CDR3 (по Кабату, Чотии, IMGT)	QYNNWPWT
5	сLC	GAAATTGTGATGACTCAGTCGCCCCGCCACCCTGTCCGTGTCTCCGGGAGAGCGGGCCACTCTGAGCTGTCGCGCGTACAGTCGGTGTCTCCAACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGACAGGCCCAAGACTGCTGATCTACGGCGCTCCACCCGGGCCACCCGGGATTCTGCCCGGTTCTCCGGTCCGGTCCGGCACTGAGTTACCCCTGACCATCAGTCACTGCAGTCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACAACA A CTGGCCGTGGACCTTTGGCCAAGGAACCAAGGTGAAATCAAG
6	320111 VH	QLPLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRSSYYWGWRQPPGKGLEWIGTIYYSGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQLSLKLSVTAADTAVYYCARPYDSSGYYYYWGQGLVTVSS
7	320111 VH	SSSYYWG
	CDR1 по Кабату	
8	320111 VH CDR2 по Кабату	TIYYSGTYYNPSLKS
9	320111 VH CDR3 по Кабату	PYYDSSGYYYY
10	320111 VH CDR1 по Чотии	GGSSIRSSSY
11	320111 VH CDR2 по Чотии	YYSGS
12	320111 VH CDR3 по Чотии	PYYDSSGYYYY
13	320111 VH CDR1 по IMGT	GGSSIRSSSYWG
14	320111 VH CDR2 по IMGT	TIYYSGSTYYNPSLKS
15	320111 VH CDR3 по IMGT	PYYDSSGYYYY
16	320111 VH	CAGCTGCCGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCCTTCGGAGACCCCTGTCCTCACCTGCACTGTTCTGGTGGCTCCATCAGGAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGACTATCTATTATAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCCACATATCCGTAGACACGTCGAAGACCCAGCTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCCGCGCAGACAGC

		GCTGTGATTACTGTGCGAGACCTTACTATGATAGTAGTGGTTATTACTACTACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTCACCGTCTCCTCA
17	320199 VH	QLQLQESGPGLVKPESETLSLTCTVSGGSISSNSYWGWRQSPGRGLEWIGRIYYSGITHYNPSLKSRTISVD TSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCASPWKWNDGNFFGWGQGLVTVSS
18	320199 VH CDR1 по Кабату	SSNSYWG
19	320199 VH CDR2 по Кабату	RIYYSGITHYNPSLKS
20	320199 VH CDR3 по Кабату	PYKWNDGNFFG
21	320199 VH CDR1 по Чотии	GGSISSNS
22	320199 VH CDR2 по Чотии	YYSGI
23	320199 VH CDR3 по Чотии	PYKWNDGNFFG
24	320199 VH CDR1 по IMGT	GGSISSNSYWG
25	320199 VH CDR2 по IMGT	RIYYSGITHYNPSLKS
26	320199 VH CDR3 по IMGT	PYKWNDGNFFG
27	320199 VH	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACT GTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAATTCCTACTGGGGCTGGATCCGCCAGTCCCCAGGGAGGGGG CTGGAGTGGATTGGGAGGATCTATTATAGTGGGATCACCCACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTC ACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGAGACACG GCTGTGATTACTGTGCGAGTCCGTATAAGTGAACGACGCGGAATTTTTTGGTTGGGGCCAGGGCACCC CTGGTCACCGTCTCCTCA
28	320262 VH	QLQLQESGPGLVKPESETLSLTCTVSGGSISNSNYWGWRQPPGKLEWIGNIYYSGRTY YTPSLKSRVTISEDTSKNQFSLKVRSVTVADTGVYYCARPDYYSGTIAWGQGLVTVSS
29	320262 VH CDR1 по Кабату	NSNYYWG
30	320262 VH CDR2 по Кабату	NIYYSGRTYTTPSLKS
31	320262 VH CDR3 по Кабату	PDYYGSGTIA
32	320262 VH CDR1 по Чотии	GGSISNSNY
33	320262 VH CDR2 по Чотии	YYSGR
34	320262 VH CDR3 по Чотии	PDYYGSGTIA
35	320262 VH	GGSISNSNYWG

	CDR1 по IMGT	
36	320262 VH CDR2 по IMGT	NIYYSGRTYYTSLKS
37	320262 VH CDR3 по IMGT	PDYYGSGTIA
38	320262 VH	CAGCTGCAGCTACAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACT GTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAATAGTAATTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGAAAGGGG CTGGAGTGGATTGGGAATATCTATTATAGTGGGAGAACCTATTACACCCCGTCCCTCAAGAGTCGCGTC ACCATATCCGAAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGGTGAGGTCTGTGACCGTCGCAGACAC GGGTGTGTATTACTGTGCGAGACCGGATTACTATGGTTCGGGGACTATCGCGTGGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTCTCTCA
39	319883 VH	QLQLQESGPGLVKPSDTLSLCTVSGSISSSNSYWGWRQSPGRGLEWIGRIYYSGITH YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCASPWKWNDGNFFGWGQGLTVTVSS
40	319883 VH CDR1 по Кабаты	SSNSYWG
41	319883 VH CDR2 по Кабаты	RIYYSGITIIYNPSLKS
42	319883 VH CDR3 по Кабаты	PYKWNDGNFFG
43	319883 VH CDR1 по Чотии	GGSISSSNSY
44	319883 VH CDR2 по Чотии	YYSGI
45	319883 VH CDR3 по Чотии	PYKWNDGNFFG
46	319883 VH CDR1 по IMGT	GGSISSSNSYWG
47	319883 VH CDR2 по IMGT	RIYYSGITHYNPSLKS
48	319883 VH CDR3 по IMGT	PYKWNDGNFFG
49	319883 VH	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACCTGCACT GTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAATTCCTACTGGGGCTGGATCCGCCAGTCCCCAGGGAGGGGG CTGGAGTGGATTGGGAGGATCTATTATAGTGGGATCACCCACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTC ACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACG GCTGTGTATTACTGTGCGAGTCCGATAAGTGGAACGACGGGAATTTTTTGGTTGGGGCCAGGGCACC CTGGTCACCGTCTCTCA
50	319966 VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGSISRSNYYWGWRQPPGKGLEWIGTFYYSGTTY YNPSLKSRTVISEDTSKKQLSLNLSVTAADTAVYYCARPSGYTTTSWGQGLTVTVSS
51	319966 VH CDR1 по Кабаты	RSNYYWG
52	319966 VH CDR2 по Кабаты	TFYYSGTTYYNPSLKS
53	319966 VH CDR3 по Кабаты	PSGYTTS
54	319966 VH	GSSISRSNY

	CDR1 по Чотии	
55	319966 VH CDR2 по Чотии	YYSGT
56	319966 VH CDR3 по Чотии	PSGYTTS
57	319966 VH CDR1 по IMGT	GSSISRSNYYWG
58	319966 VH CDR2 по IMGT	TFYYSGTYYNPSLKS
59	319966 VH CDR3 по IMGT	PSGYTTS
60	319966 VH	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACT GTCTCTGGAAGCTCCATCAGCAGGAGTAATTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGT CTGGAGTGGATTGGGACTTTCTATTATAGTGGGACCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTC A CCATATCCGAAGACACGTCCAAGAACAGTTATCCCTGAACCTGAGGTCTGTGACCCCGACAGACACGG CTGTGTATTACTGTGCGAGACCTCCGGATATACCACCAGCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCT C CTCA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывается с антигеном созревания В-клеток (BCMA), или BCMA-связывающий фрагмент антитела, содержащее:

(A) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи:

- a) SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, соответственно;
- b) SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно;
- c) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, соответственно;
- d) SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно;
- e) SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно;
- f) SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно;
- g) SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31, соответственно;
- h) SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно;
- i) SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37, соответственно;
- j) SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно;
- k) SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 45, соответственно;
- l) SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, соответственно;
- m) SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53, соответственно;
- n) SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56, соответственно; или
- o) SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно; и

(B) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно.

2. Антитело или его BCMA-связывающий фрагмент по п.1, содержащее легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 или CDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно, и

тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 с последовательностями:

- a) SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, соответственно;
- b) SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; или
- c) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, соответственно.

3. Антитело или его BCMA-связывающий фрагмент по п.1, содержащее легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 или CDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно, и

тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 с последовательностями:

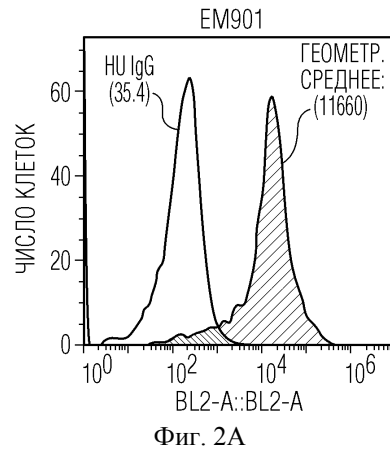
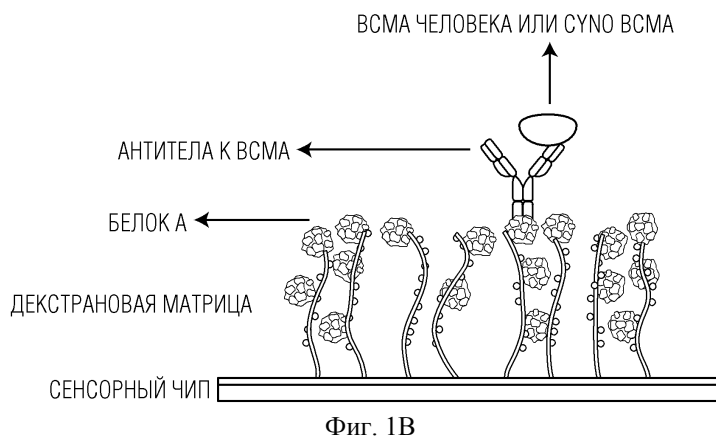
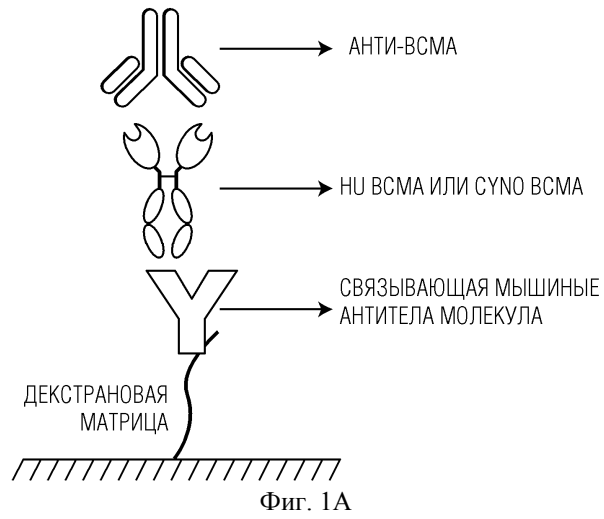
- a) SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно;
- b) SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно; или
- c) SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно.

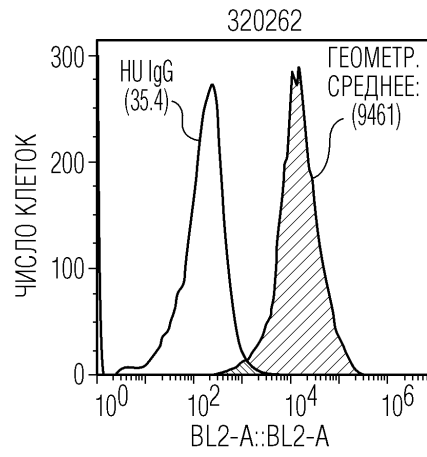
4. Антитело или его BCMA-связывающий фрагмент по п.1, содержащее легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 или CDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно, и

тяжелую цепь, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3:

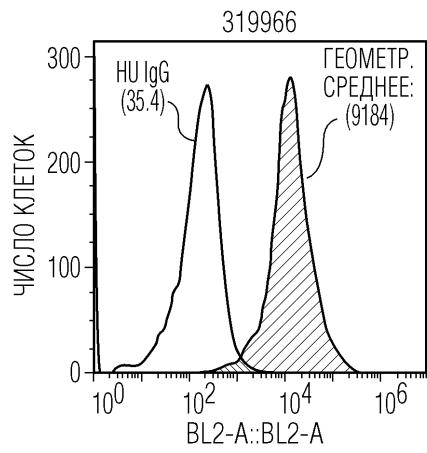
- a) SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31, соответственно;
- b) SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно; или

- с) SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37, соответственно.
5. Антитело или его ВСМА-связывающий фрагмент по п.1, содержащее легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 или CDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно, и тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 с последовательностями:
- SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно;
 - SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 45, соответственно; или
 - SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, соответственно.
6. Антитело или его ВСМА-связывающий фрагмент по п.1, содержащее легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 или CDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно, и тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 с последовательностями:
- SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53, соответственно;
 - SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56, соответственно; или
 - SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно.
7. Антитело или его связывающий фрагмент по п.1, которое содержит вариабельный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 1.
8. Антитело или его связывающий фрагмент по п.1, которое содержит вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 50.
9. Антитело по п.1, где указанное антитело представляет собой Triomab, "knob-in-hole" (kih) IgG с общей легкой цепью, CrossMAb, орто-Fab IgG, DVD-Ig, 2 в 1-IgG, IgG-scFv, scFv₂-Fc, би-нанотело, TandAb, DART, DART-Fc, scFv-HSA-scFv mniDNL-Fab3.
10. Антитело или его ВСМА-связывающий фрагмент по п.1, где связывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), Fab-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент.
11. Полипептид, который содержит:
- (A) CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи с последовательностями:
- SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, соответственно;
 - SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно;
 - SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, соответственно;
 - SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно;
 - SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно;
 - SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно;
 - SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31, соответственно;
 - SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно;
 - SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37, соответственно;
 - SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно;
 - SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 45, соответственно;
 - SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, соответственно;
 - SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53, соответственно;
 - SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56, соответственно; или
 - SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно; и
- (B) CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно; и где тяжелая цепь и легкая цепь образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с ВСМА.
12. Полипептид по п.11, который содержит вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 1.
13. Полипептид по п.11, который содержит вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 50.
14. Способ истощения ВСМА-экспрессирующих клеток у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его ВСМА-связывающего фрагмента или полипептида по п.1.

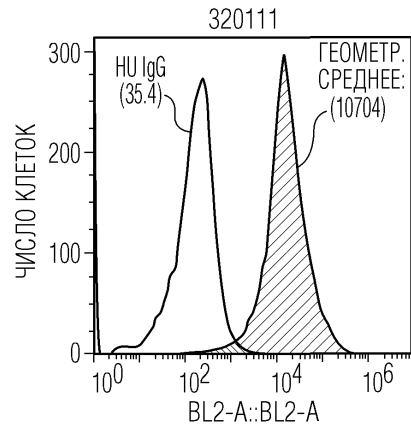




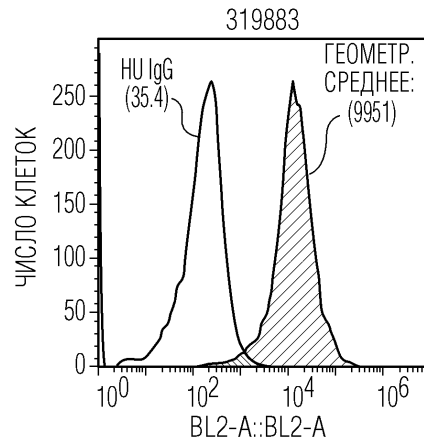
Фиг. 2В



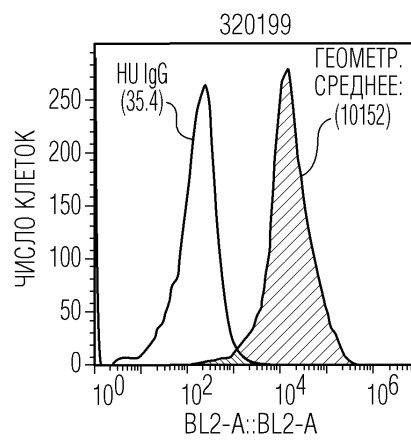
Фиг. 2С



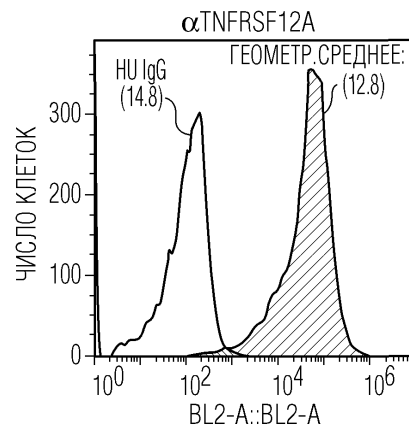
Фиг. 2D



Фиг. 2Е

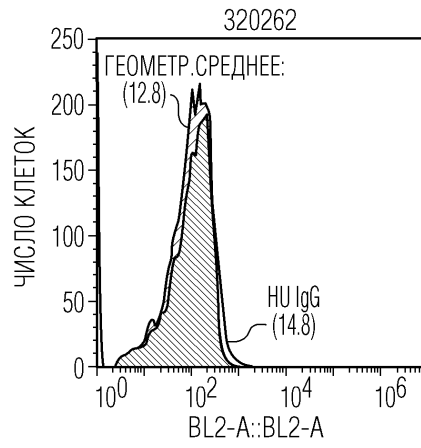


Фиг. 2F

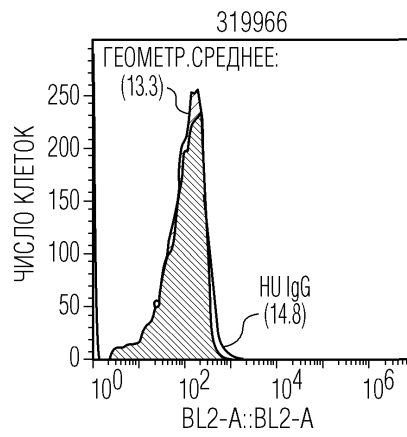


Фиг. 3А

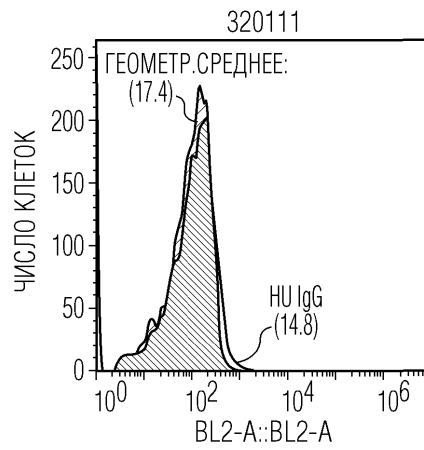
044652



Фиг. 3В

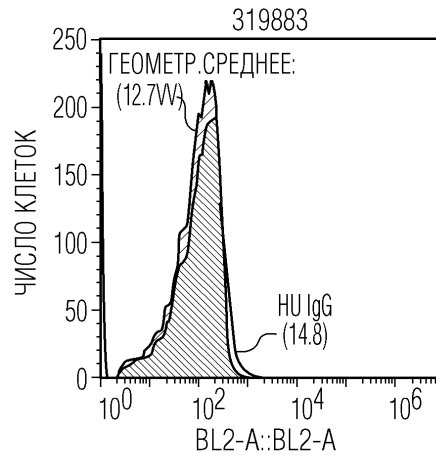


Фиг. 3С

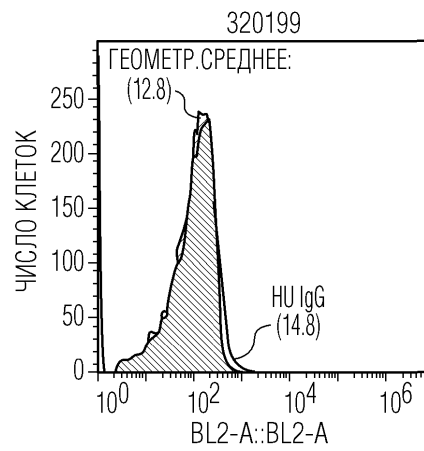


Фиг. 3Д

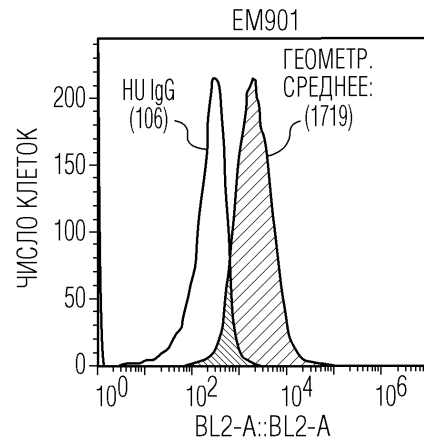
044652



Фиг. 3Е

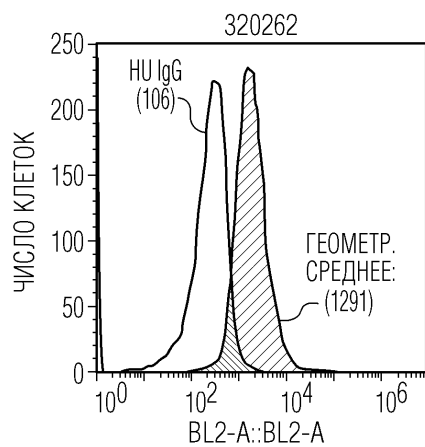


Фиг. 3F

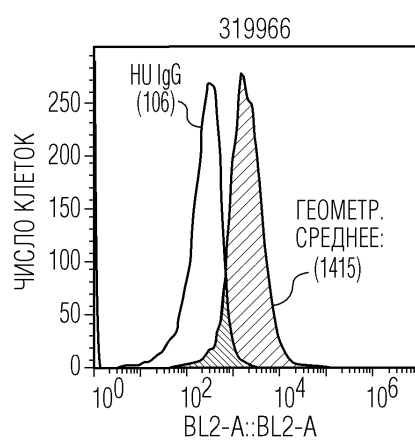


Фиг. 4А

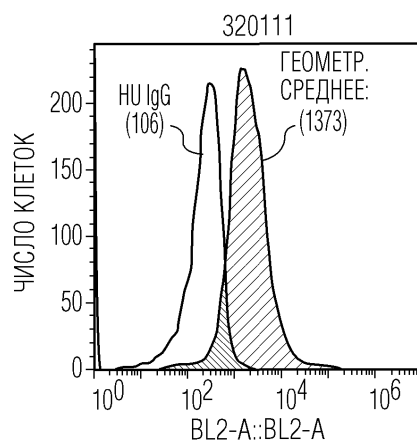
044652



Фиг. 4В

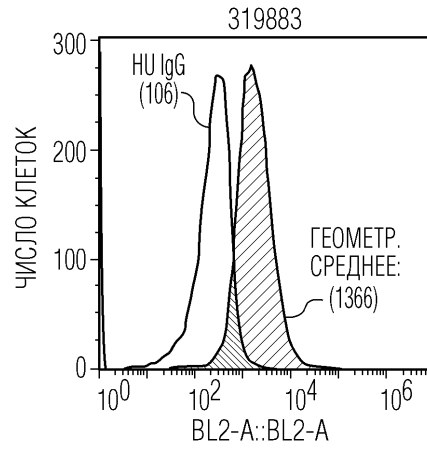


Фиг. 4С

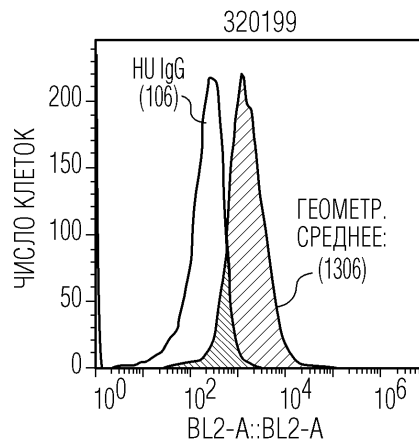


Фиг. 4D

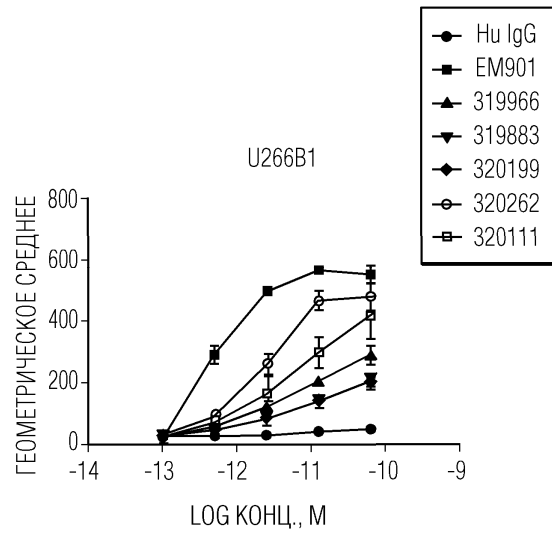
044652



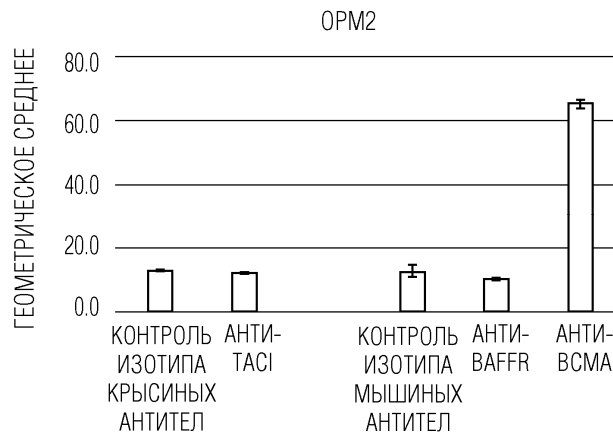
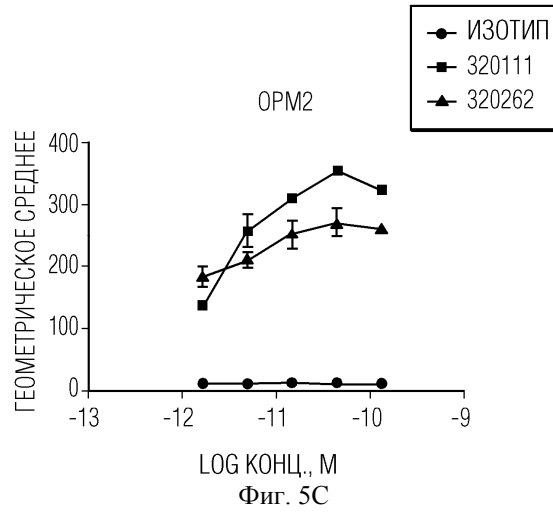
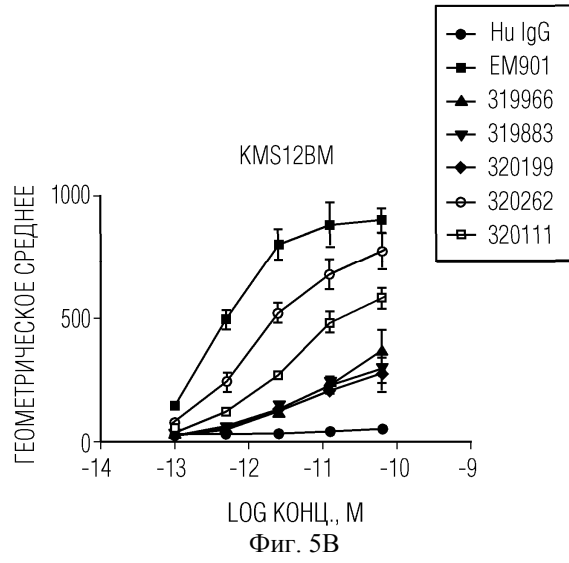
Фиг. 4Е



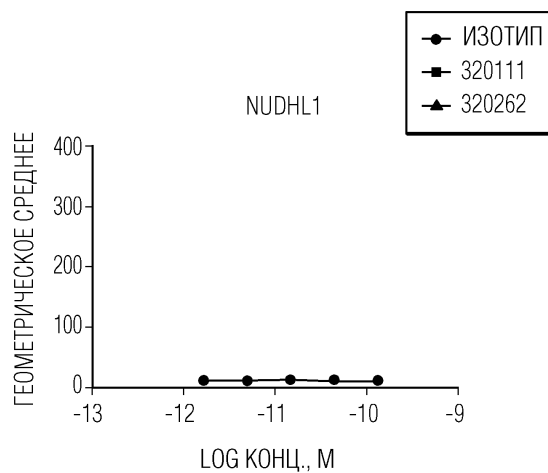
Фиг. 4F



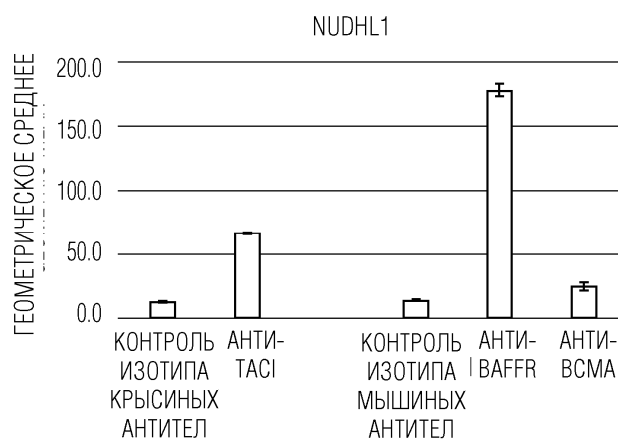
Фиг. 5А



Фиг. 5D



Фиг. 5E



Фиг. 5F

