

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046661**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |                                       |               |                              |
|---------------------------------------|---------------|------------------------------|
| (45) Дата публикации и выдачи патента | (51) Int. Cl. | <i>C07K 19/00</i> (2006.01)  |
| <b>2024.04.05</b>                     |               | <i>C07K 14/725</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки                     |               | <i>C07K 16/28</i> (2006.01)  |
| <b>201890302</b>                      |               | <i>C07K 16/30</i> (2006.01)  |
| (22) Дата подачи заявки               |               | <i>C12N 15/62</i> (2006.01)  |
| <b>2016.08.10</b>                     |               | <i>C12N 15/63</i> (2006.01)  |
|                                       |               | <i>C12N 5/10</i> (2006.01)   |
|                                       |               | <i>A61P 35/00</i> (2006.01)  |

---

(54) **ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ АНТИГЕНОВ НА ОСНОВЕ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

- |  |                       |
|--|-----------------------|
| (31) 201510490002.8; 201510733585.2  | (56) WO-A1-2013123061 |
| (32) 2015.08.11; 2015.11.02  |                       |
| (33) CN  |                       |
| (43) 2018.10.31  |                       |
| (86) PCT/CN2016/094408   |                       |
| (87) WO 2017/025038 2017.02.16   |                       |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:<br>ЛЕДЖЕНД БАЙОТЕК АЙРЛЕНД<br>ЛИМИТЕД (IE)   |                       |
| (72) Изобретатель:<br>Фан Сяоху (CA), Чоу Чуан-Чу (US),<br>Чжуанг Цючуань, Ван Пингуань, Ван<br>Линь, Ян Лэй, Хао Цзяин (CN)                                 |                       |
| (74) Представитель:<br>Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,<br>Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов<br>А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,<br>Соколов Р.А. (RU) |                       |

- 
- (57) В изобретении предложены однодоменные антитела и химерные рецепторы антигенов, содержащие один или большее количество антигенсвязывающих доменов, каждый из которых содержит однодоменное антитело. Дополнительно предложены сконструированные иммунные эффекторные клетки (такие как Т-клетки), содержащие химерные рецепторы антигенов. Также предложены фармацевтические композиции, наборы и способы лечения рака.

**B1**

**046661**

**046661**  
**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет по заявке на патент Китая № CN201510490002.8, поданной 11 августа 2015 г., и заявке на патент Китая № CN201510733585.2, поданной 2 ноября 2015 г., содержание которых включено в данное описание посредством ссылки в полном объеме.

### Представление перечня последовательностей в текстовом файле ASCII

Содержание следующего документа в текстовом файле ASCII включено в данное описание посредством ссылки в полном объеме: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (имя файла: 761422000340SEQLISTING.txt, дата записи: 9 августа 2016 г., размер: 355 КБ).

### Область техники

Данное изобретение относится к однодоменным антителам, химерным антигенным рецепторам, сконструированным иммунным эффекторным клеткам и способам их применения. Данное изобретение также относится к активации и размножению клеток для терапевтического применения, особенно для Т-клеточной иммунотерапии на основе химерных антигенных рецепторов.

### Уровень техники

В настоящее время с развитием иммунотерапии опухолей и медицинских технологий Т-клеточная иммунотерапия на основе химерных антигенных рецепторов (CAR-T) является одним из наиболее перспективных направлений в иммунотерапии опухолей. Как правило, химерный рецептор антигенов (CAR) включает внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Внеклеточный антигенсвязывающий домен может содержать одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), нацеленный на идентифицированный опухолевый антиген. CAR могут быть экспрессированы на поверхности Т-клеток с помощью методов генного трансфицирования. При связывании с опухолевым антигеном-мишенью CAR могут активировать Т-клетки для запуска специфического противоопухолевого ответа антигензависимым образом, не ограничиваясь наличием основных комплексов гистосовместимости (МНС), специфичных для опухолевого антигена-мишени.

Однодоменные антитела (sdAb) отличаются от обычных четырехцепочечных антител наличием одного вариабельного домена мономерного антитела. Например, представители семейства верблюдовых и акулы продуцируют однодоменные антитела, называемые антителами только с тяжелой цепью (HcAb), которые по своей природе не имеют легких цепей. Антигенсвязывающий фрагмент в каждом плече антитела только с тяжелой цепью в представителей семейства верблюдовых имеет один вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_{\text{H}}\text{H}$ ), который может характеризоваться высокой аффинностью к антигену без содействия легкой цепи.  $V_{\text{H}}\text{H}$  у представителей семейства верблюдовых известен как наименьший функциональный антигенсвязывающий фрагмент с молекулярной массой около 15 кДа.

Описания всех публикаций, патентов, заявок на патент и опубликованных патентных заявок, упомянутых в данном документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

### Краткое описание сущности изобретения

В данном изобретении предложены однодоменные антитела, химерные рецепторы антигенов (CAR) на основе однодоменных антител (такие как  $V_{\text{H}}\text{H}$  - фрагменты), сконструированные иммунные эффекторные клетки и способы их применения при иммунотерапии рака.

В одном аспекте данного изобретения предлагается анти-CD19 sdAb, содержащее CDR-области SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb содержит домен  $V_{\text{H}}\text{H}$ , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-CD19 только с тяжелой цепью (HcAb) или антигенсвязывающий белок, содержащий любое из описанных выше анти-CD19 sdAb.

В одном аспекте данного изобретения предлагается химерный рецептор антигенов CD19, содержащий (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD19 sdAb (такое как любое из описанных выше анти-CD19 sdAb); (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моновалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является поливалентным (например, двухвалентным или трехвалентным). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является мультиспецифическим (например, биспецифическим).

В одном аспекте данного изобретения предлагается анти-CD20 sdAb, содержащее CDR-области SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb содержит домен  $V_{\text{H}}\text{H}$ , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-CD20 только с тяжелой цепью (НСАВ) или антигенсвязывающий белок, содержащий любое из описанных выше анти-CD20 sdAb.

В одном аспекте данного изобретения предлагается химерный рецептор антигенов CD20, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD20 sdAb (такое как любое из описанных выше анти-CD20 sdAb); (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моновалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является поливалентным (например, двухвалентным или трехвалентным). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является мультиспецифическим (например, биспецифическим).

В одном аспекте данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее CDR-области любой одной из SEQ ID NO: 78-88. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит любую из следующих областей:

(1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29;

(2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;

(3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

(4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

(5) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;

(6) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;

(7) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

(8) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

(9) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37;

(10) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; или

(11) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 78-88.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-BCMA только с тяжелой цепью (НСАВ) или антигенсвязывающий белок, содержащий любое из описанных выше анти-BCMA sdAb.

В одном аспекте данного изобретения предлагается химерный рецептор антигенов BCMA, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-BCMA sdAb (такое как любое из описанных выше анти-BCMA sdAb); (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моновалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является поливалентным (например, двухвалентным или трехвалентным). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является мультиспецифическим (например, биспецифическим).

В одном аспекте данного изобретения предлагается анти-CD38 sdAb, содержащее CDR-области

любой одной из SEQ ID NO: 89-100. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD38 sdAb содержит любую из следующих областей:

(1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64;

(2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65;

(3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

(4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67;

(5) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;

(6) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69;

(7) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

(8) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

(9) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72;

(10) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73;

(11) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; или

(12) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD38 sdAb содержит домен  $V_HH$ , содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-100.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-BCMA только с тяжелой цепью (HCAB) или антигенсвязывающий белок, содержащий любое из описанных выше анти-BCMA sdAb.

В одном аспекте данного изобретения предлагается химерный рецептор антигенов CD38, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD38 sdAb (такое как любое из описанных выше анти-CD38 sdAb); (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моновалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является поливалентным (например, двухвалентным или трехвалентным). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является мультиспецифическим (например, биспецифическим).

В одном аспекте данного изобретения предлагается химерный рецептор антигенов CD22, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD22 sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моновалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является поливалентным (например, двухвалентным или трехвалентным). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является мультиспецифическим (например, биспецифическим).

В одном аспекте данного изобретения предлагается химерный рецептор антигенов (CAR), содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с первым антигеном, и второе одно-

доменное антитело (sdAb), специфически связывающееся со вторым антигеном; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb расположено на N-конце второго sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb расположено на C-конце второго sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения согласно любому из CAR, описанных выше, первый антиген и второй антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb представляет собой анти-BCMA sdAb, такое как любое одно из BCMA sdAb, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий по меньшей мере две копии (например, 2, 3 и более копий) анти-BCMA sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb представляет собой анти-CD19 sdAb, такое как любое из описанных выше анти-CD19 sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb представляет собой анти-CD20 sdAb, такое как любое из описанных выше анти-CD20 sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb представляет собой анти-CD38 sdAb, такое как любое из описанных выше анти-CD38 sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий по меньшей мере две копии (например, 2, 3 и более копий) анти-CD38 sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb представляет собой анти-CD22 sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения согласно любому из CAR, описанных выше, первый антиген отличается от второго антигена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является мультиспецифическим, например биспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb представляет собой анти-BCMA sdAb, а второе sdAb представляет собой анти-CD38 sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb представляет собой анти-BCMA sdAb, а второе sdAb представляет собой анти-CD19 sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb представляет собой анти-CD19 sdAb, а второе sdAb представляет собой анти-CD20 sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb представляет собой анти-CD19 sdAb, а второе sdAb представляет собой анти-CD20 sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb представляет собой анти-CD19 sdAb, а второе sdAb представляет собой анти-CD22 sdAb.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения согласно любому из моноспецифических CAR, описанных выше, первый антиген является таким же, как второй антиген. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является двухвалентным или трехвалентным. В некоторых вариантах осуществления первого sdAb и второе sdAb специфически связываются с одним и тем же эпитопом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb является таким же, как второе sdAb. В некоторых вариантах осуществления первого sdAb и второе sdAb специфически связываются с различными эпитопами.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения согласно любому из CAR, описанных выше, первое sdAb и/или второе sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным антителом.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения согласно любому из CAR, описанных выше, первое sdAb и второе sdAb являются непосредственно слитыми друг с другом с помощью пептидной связи. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb и второе sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 144-151.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения согласно любому из CAR (включая CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR и CD22 CAR), описанных выше, трансмембранный домен получен из молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8a, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен получен из CD8 или CD28. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132 или SEQ ID NO: 133. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения согласно любому из CAR (включая CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR и CD22 CAR), описанных выше, внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как T-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140 или SEQ ID NO: 141.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения согласно любому из CAR (включая CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR и CD22 CAR), описанных выше, внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы,

выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен содержит цитоплазматический домен CD28 и/или цитоплазматический домен CD137. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136 и/или SEQ ID NO: 137. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения согласно любому из CAR (включая CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR и CD22 CAR), описанных выше, CAR дополнительно содержит шарнирный домен, расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен получен из CD8 $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR дополнительно содержит сигнальный пептид, расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид получен из молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , ГМКСФ-рецептора  $\alpha$  и тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид получен из CD8 $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127.

В одном аспекте данного изобретения предлагается химерный рецептор антигенов любого из перечисленных в табл. 4, 5 и 6 элемента. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 152-174, 198-201, 206-216, 248-249, 257-260 и 265-270.

В одном аспекте данного изобретения предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 76-100, 152-174, 198-201, 206-216, 248-249, 257-260 и 265-270.

В одном аспекте данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любой из CAR (включая CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR и CD22 CAR), описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения последовательность нуклеиновой кислоты выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 175-197, 202-205, 217-227, 250-251, 261-264 и 271-276. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность второй нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CAR, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, функционально связана с последовательностью второй нуклеиновой кислоты посредством последовательности третьей нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид, такой как пептид T2A, P2A или F2A. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения последовательность третьей нуклеиновой кислоты представляет собой SEQ ID NO: 256. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК.

В одном аспекте данного изобретения предлагается вектор, содержащий любую из выделенных нуклеиновых кислот, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой лентивирусный вектор.

В одном аспекте данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка, содержащая любой из CAR (включая CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR и CD22 CAR), описанных выше, или любую из выделенных нуклеиновых кислот, описанных выше, или любой из описанных выше векторов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка содержит или экспрессирует два или большее количество CAR (включая CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR и CD22 CARs), описанных выше, при этом два или большее количество CAR специфически связываются с различными антигенами. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (МНКП), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку.

В одном аспекте данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая любую из сконструированных иммунных эффекторных клеток, описанных выше, и фармацевтически приемлемый носитель. Дополнительно предлагается способ лечения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества любой из фармацевтических композиций, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществле-

ния данного изобретения рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой множественную миелому, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой солидный рак, такой как глиобластома.

В одном аспекте данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая любое из анти-CD19 sdAb, анти-CD20 sdAb, анти-CD38 sdAb или анти-BCMA sdAb, описанных выше, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения заболевания (такого как рак) у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции.

Также предлагаются способы применения, наборы и готовые изделия, содержащие любые однодоменные антитела, CAR, сконструированные иммунные эффекторные клетки, выделенные нуклеиновые кислоты или векторы, описанные выше.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1A приведено сравнение структуры CAR на основе  $V_{HH}$  и обычного CAR на основе scFv. Схематическая структура слева демонстрирует типовой моноспецифический моновалентный CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий домен  $V_{HH}$ . Схематическая структура справа демонстрирует типовой моноспецифический моновалентный CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит домен scFv.

На фиг. 1B приведено сравнение структуры CAR на основе  $V_{HH}$ , имеющего два антигенсвязывающих участка, и обычного CAR на основе scFv, имеющего два антигенсвязывающих участка. Схематическая структура слева демонстрирует типовой CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит два домена  $V_{HH}$ . Два домена  $V_{HH}$  могут быть одинаковыми или разными. Схематическая структура справа демонстрирует типовой CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит домен scFv. Два домена scFv могут быть одинаковыми или разными.

На фиг. 1C проиллюстрированы схематические структуры типовых двухвалентных и биспецифических CAR на основе  $V_{HH}$ . Схематическая структура на верхней левой панели иллюстрирует типовой моноспецифический двухвалентный CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий два идентичных домена  $V_{HH}$ , каждый из которых специфически связывается с эпитопом 1 антигена А. Схематическая структура на верхней правой панели иллюстрирует типовой моноспецифический двухвалентный CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый домен  $V_{HH}$ , специфически связывающийся с эпитопом 1 антигена А, и второй домен  $V_{HH}$ , специфически связывающийся с эпитопом 2 антигена А. Эпитоп 1 и эпитоп 2 антигена А могут отличаться по своей структуре и/или последовательностям. Схематическая структура в нижней левой панели иллюстрирует типовой биспецифический CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый домен  $V_{HH}$ , специфически связывающийся с антигеном А, и второй домен  $V_{HH}$ , специфически связывающийся с антигеном В. Антиген А и антиген В представляют собой разные антигены.

На фиг. 1D проиллюстрированы схематические структуры типовых CAR на основе  $V_{HH}$ , имеющих три или большее количество доменов  $V_{HH}$ . CAR могут иметь множество доменов  $V_{HH}$ , слитых друг с другом непосредственно или посредством пептидных линкеров. Домены  $V_{HH}$  могут быть одинаковыми или разными. Различные домены  $V_{HH}$  могут специфически связываться с различными эпитопами на одном и том же антигене или на разных антигенах.

На фиг. 1E проиллюстрированы типовые сконструированные иммунные эффекторные клетки, коэкспрессирующие два разных CAR на основе  $V_{HH}$ . Типовые сконструированные иммунные эффекторные клетки на левой панели коэкспрессируют два разных моноспецифических одновалентных CAR. Типовые сконструированные иммунные эффекторные клетки на средней панели коэкспрессируют моноспецифический, моновалентный CAR и биспецифический или двухвалентный CAR. Типовые сконструированные иммунные эффекторные клетки на правой панели коэкспрессируют два разных биспецифических или двухвалентных CAR. CAR могут распознавать разные антигены.

На фиг. 2A приведены результаты анализа цитотоксичности Т-клеток *in vitro*, экспрессирующих типовые моноспецифические CAR, содержащие различные антитела анти-BCMA (т.е. анти-CD269) или анти-CD38 однодоменные антитела против клеточной линии множественной миеломы RPMI8226. Luc.

На фиг. 2B приведены результаты анализа цитотоксичности Т-клеток *in vitro*, экспрессирующих типовые моноспецифические CAR, содержащие различные антитела анти-BCMA (т.е. анти-CD269) или анти-CD38 однодоменные антитела против клеточной линии глиобластомы U87MG. Luc.

На фиг. 3A приведены результаты анализа цитотоксичности Т-клеток *in vitro*, экспрессирующих типовые биспецифические CAR против клеточной линии множественной миеломы RPMI8226. Luc.

На фиг. 3B приведены результаты анализа цитотоксичности Т-клеток *in vitro*, экспрессирующих типовые биспецифические CAR против клеточной линии множественной миеломы RPMI8226. Luc.

На фиг. 4 приведены результаты анализа цитотоксичности Т-клеток *in vitro*, экспрессирующих типовые биспецифические CAR против клеточной линии множественной миеломы RPMI8226. Luc.

На фиг. 5 проиллюстрированы конструкции типового биспецифического CAR, нацеленного на CD19 и CD20, типового моноспецифического CAR, нацеленного на CD19, и типового моноспецифиче-

ского CAR, нацеленного на CD20.

На фиг. 6 приведены результаты анализа цитотоксичности различных Т-клеток *in vitro*. На верхней левой панели приведены результаты нетрансдуцированных контрольных Т-клеток. На верхней правой панели приведены результаты Т-клеток, экспрессирующих типовой CD19 CAR. На нижней левой панели приведены результаты Т-клеток, экспрессирующих типовой CD20 CAR. На нижней правой панели приведены результаты Т-клеток, экспрессирующих типовой биспецифический CD19×CD20 CAR.

На фиг. 7 приведены результаты противоопухолевого анализа Т-клеток *in vivo*, экспрессирующих типовой биспецифический CAR, нацеленный на CD19 и CD20.

На фиг. 8А приведены результаты анализа цитотоксичности Т-клеток *in vitro*, экспрессирующих типовые моноспецифические, двухвалентные CAR против клеточной линии множественной миеломы RPMI8226. Luc. Каждый CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий два разных анти-BCMA (т.е. анти-CD269) sdAb.

На фиг. 8В приведены результаты анализа цитотоксичности Т-клеток *in vitro*, экспрессирующих типовые моноспецифические двухвалентные CAR против клеточной линии глиобластомы U87MG. Luc. Каждый CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий два разных анти-BCMA (т.е. анти-CD269) sdAb.

### Подробное описание сущности изобретения

В данном изобретении предлагаются моноспецифические, мультиспецифические (такие как биспецифические) и поливалентные (такие как двухвалентные или трехвалентные) химерные рецепторы антигенов, содержащие однодоменные антитела (sdAb) на основе внеклеточных антигенсвязывающих доменов. В отличие от антигенсвязывающих фрагментов, полученных из обычных четырехцепочечных антител, sdAb содержат только один вариабельный домен, такой как V<sub>H</sub>H. Таким образом, sdAbs имеют намного меньший размер, чем антигенсвязывающие фрагменты, такие как scFvs, которые в данное время применяются в качестве внеклеточных антигенсвязывающих доменов в CAR. Кроме того, поскольку нет необходимости в спаривании тяжелой цепи и легкой цепи при фолдинге sdAb, нарушения фолдинга внеклеточного антигенсвязывающего домена можно уменьшить в сконструированных иммунных клетках, экспрессирующих CAR на основе sdAb. CAR с внеклеточными антигенсвязывающими доменами, содержащими множественные копии sdAb или множественные sdAb, нацеленные на различные эпитопы или антигены, можно успешно сконструировать и получить рекомбинантным путем, тем самым обеспечивая эффективную платформу для подготовки и скрининга поливалентных и мультиспецифических CAR. Кроме того, небольшой размер sdAb может обеспечить доступ CAR к скрытым антигенам-мишеням и эпитопам в опухолевых тканях.

Мультиспецифические и поливалентные CAR могут характеризоваться более высокой эффективностью по сравнению с моноспецифическими одновалентными CAR при иммунотерапии рака. Раковые клетки являются генетически нестабильными, что позволяет им избегать нацеленного на них воздействия путем мутации или потери генов, кодирующих антигены-мишени. В результате нацеливания на два или большее количество различных эпитопов или антигенов на раковых клетках поливалентные или мультиспецифические CAR могут сделать более трудной полноценное уклонение раковых клеток от нацеленного на них воздействия с помощью сконструированных иммунных эффекторных клеток (таких как Т-клетки), экспрессирующих CAR. Из-за их небольшого размера тандемно-слитые однодоменные антитела, которые применяются в качестве внеклеточных антигенсвязывающих доменов в поливалентных или мультиспецифических CAR по данному изобретению, могут сохранять свою индивидуальную структурную целостность и связывание с антигенами-мишенями, тем самым обеспечивая эффективное нацеливание CAR на каждый эпитоп или антиген. Сконструированные иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие поливалентные или мультиспецифические CAR или коэкспрессирующие два или большее количество химерных антигенных рецепторов, которые нацелены на различные опухолевые антигены, могут преодолевать механизмы уклонения опухоли от иммунного ответа, которые обусловлены нарушениями в белково-антигенном процессинге и презентации.

Соответственно, в одном аспекте данного изобретения предлагается мультиспецифический (например, биспецифический) химерный рецептор антигенов (CAR), содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с первым антигеном, и второе однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся со вторым антигеном; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый антиген отличается от второго антигена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый антиген представляет собой BCMA, а второй антиген представляет собой CD38. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый антиген представляет собой CD19, а второй антиген представляет собой BCMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый антиген представляет собой CD19, а второй антиген представляет собой CD20. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый антиген представляет собой CD19, а второй антиген представляет собой CD22. В другом аспекте предлагается поливалентный химерный рецептор антигенов (CAR), содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество однодоменных антител (sdAb), специфически связывающихся с

антигеном; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен.

В другом аспекте предлагается поливалентный химерный рецептор антигенов (CAR), содержащий полипептид, который содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело, специфически связывающееся с первым эпитопом антигена, и второе однодоменное антитело, специфически связывающееся со вторым эпитопом антигена; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп отличается от второго эпитопа.

Кроме того, предлагаются новые анти-CD19, анти-CD20, анти-BCMA и анти-CD38 однодоменные антитела и химерные рецепторы антигенов, содержащие любое из sdAb.

Также в данном документе описаны сконструированные иммунные эффекторные клетки (такие как Т-клетки), содержащие CAR, фармацевтические композиции, наборы, готовые изделия и способы лечения рака с применением сконструированных иммунных эффекторных клеток или однодоменных антител.

#### I. Определения.

Если специально не указано иное, при практической реализации данного изобретения будут применяться общепринятые методы вирусологии, иммунологии, микробиологии, молекулярной биологии и технологии рекомбинантных ДНК, известные специалисту в данной области техники, многие из которых описаны ниже в иллюстративных целях. Такие технологии подробно описаны в литературе. См., например, *Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (2009); Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 3<sup>rd</sup> ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984) и другие подобные ссылки.

Термин "антитело" включает моноклональные антитела (включая полноразмерные четырехцепочечные антитела или полноразмерные антитела только с тяжелой цепью, которые имеют Fc-область иммуноглобулина), композиции антител с полиэпитопической специфичностью, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, диатела и одноцепочечные молекулы), а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')<sub>2</sub> и Fv). В данном контексте термин "иммуноглобулин" (Ig) применяется взаимозаменяемо с термином "антитело". Антитела, рассматриваемые в данном документе, включают в себя однодоменные антитела, такие как антитела только с тяжелой цепью.

Основной единицей четырехцепочечного антитела является гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Антитело IgM состоит из пяти основных гетеротетрамерных единиц вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и содержит 10 антигенсвязывающих участков, тогда как антитела IgA состоят из 2-5 основных четырехцепочечных единиц, которые могут полимеризоваться с образованием поливалентных комплексов в комбинации с J-цепью. В случае IgG четырехцепочечная единица обычно имеет массу около 150000 Да. Каждая L-цепь связана с H-цепью посредством одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом посредством одной или большего количества дисульфидных связей в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также имеет расположенные с равными интервалами межцепочечные дисульфидные мостики. На N-конце каждая H-цепь имеет переменный домен (V<sub>H</sub>), за которым следуют три константных домена (C<sub>H</sub>) для каждой α- и γ-цепей и четыре C<sub>H</sub>-домена для μ- и ε-изоформ. На N-конце каждая L-цепь имеет переменный домен (V<sub>L</sub>), за которым следует константный домен на ее другом конце. V<sub>L</sub> выравнивается с V<sub>H</sub>, а C<sub>L</sub> выравнивается с первым константным доменом тяжелой цепи (C<sub>H1</sub>). Предполагается, что конкретные аминокислотные остатки образуют область взаимодействия между переменными доменами легкой и тяжелой цепи. Спаривание V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> вместе образует антигенсвязывающий участок. Относительно структуры и свойств разных классов антител, см., например, *Basic and Clinical Immunology*, 8<sup>th</sup> Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Tarr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, p. 71, Ch. 6. L-цепь, полученную от любого вида позвоночных можно отнести к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена своих тяжелых цепей (C<sub>H</sub>), иммуноглобулины можно отнести к различным классам или изоформам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющие тяжелые цепи, обозначенные соответственно α, δ, ε, γ и μ. Классы γ и α дополнительно разделяются на подклассы на основе относительно незначительных различий в последовательности C<sub>H</sub> и функционирования, например, организм человека экспрессирует следующие подклассы: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Термин "антитело только с тяжелой цепью" или "HcAb" относится к функциональному антителу, которое содержит тяжелые цепи, но не содержит легких цепей, обычно встречающихся в четырехцепочечных антителах. Известно, что животные семейства верблюдовых (например, верблюды, ламы или альпаки) продуцируют HcAb.

Термин "однодоменное антитело" или "sdAb" относится к полипептиду, связывающему один антиген и имеющему три области, определяющие комплементарность (CDR). Антитело sdAb само способно связываться с антигеном без спаривания с соответствующим CDR-содержащим полипептидом. В некоторых случаях однодоменные антитела сконструированы из верблюдовых антител HcAb, а их переменные домены тяжелой цепи упоминаются в данном документе как "V<sub>H</sub>H". Некоторые V<sub>H</sub>H также могут быть известны как нанотела. Верблюдовое sdAb является одним из наименьших известных антигенсвязывающих фрагментов антител (см., например, Hamers-Casterman et al., *Nature*, 363:446-8 (1993); Greenberg et al., *Nature*, 374:168-73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh et al., *Nanomedicine (Lond)*, 8:1013-26 (2013)). Основной V<sub>H</sub>H имеет следующую структуру от N-конца до C-конца: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, в котором FR1-FR4 относятся к каркасным областям с 1 по 4 и в котором CDR1-CDR3 относятся к областям 1-3, определяющим комплементарность.

"Выделенным" антителом является такое антитело, которое было идентифицировано, выделено и/или извлечено из компонента его продуцирующей среды (например, природное или рекомбинантное). Предпочтительно выделенный полипептид не связан с какими-либо другими компонентами из его продуцирующей среды. Контаминирующие компоненты его продуцирующей среды, такие как рекомбинантные трансфицированные клетки, представляют собой вещества, которые, как правило, препятствуют исследованию, диагностическому или терапевтическому применению антител и могут включать в себя ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения полипептид будет очищен (1) более чем на 95 мас.%, антитела, например, по методике Лоури, а в некоторых вариантах осуществления - более чем на 99 мас.%; (2) до степени, являющейся достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с помощью секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до получения гомогенности с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстановительных или невосстановительных условиях с применением, например, красителя Кумасси синего или серебряного. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один из компонентов природной среды антитела отсутствует. В то же время выделенный полипептид или антитело, как правило, получают с применением по меньшей мере одного этапа очистки.

Термин "переменная область" или "переменный домен" антитела относится к N-концевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи могут быть обозначены как "V<sub>H</sub>" и "V<sub>L</sub>" соответственно. Как правило, эти домены являются наиболее переменными частями антитела (относительно других антител того же класса) и содержат антигенсвязывающие участки. Антитела только с тяжелой цепью, полученные от представителей видов верблюдовых, имеют одну переменную область тяжелой цепи, которая обозначается как "V<sub>H</sub>H". Таким образом, V<sub>H</sub>H является особым типом V<sub>H</sub>.

Термин "переменный" относится к тому факту, что среди антител некоторые сегменты переменных доменов сильно различаются по последовательностям. V-домен опосредует антигенное связывание и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. В то же время переменность не является равномерно распределенной по всему диапазону переменных доменов. Напротив, переменность сосредоточена в трех сегментах переменных доменов как легкой, так и тяжелой цепи, называемых гиперпеременными областями (HVR). Более консервативные фрагменты переменных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый переменный домен природных легких и тяжелых цепей содержит четыре FR-области, преимущественно принимающих конфигурацию бета-листа и соединенных тремя HVR, образующими петли, соединяющие структуры бета-типа, а в некоторых случаях - являющиеся их частью. HVR каждой цепи объединены друг с другом в непосредственной близости посредством FR-областей и вместе с HVR другой цепи участвуют в образовании антигенсвязывающего участка антител (см. Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)*). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, однако проявляют различные эффекторные функции, например участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности.

В данном контексте термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу однородных антител, т.е. из популяции, отдельные антитела в которой являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, направленными на один антигенный участок. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают в себя разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено на одну детерминанту антигена. Кроме своей специфичности, преимущество препаратов моноклональных антител заключается в том, что они синтезированы гибридной культурой или рекомбинантно и не контаминированы другими иммуноглобулинами. Модификатор "моноклональное" указывает на свойство антитела, как на полученное по существу из однородной популяции антител, при этом значение этого модификатора не следует интерпретировать как необходимость продукции антитела посредством какого-либо конкретного способа. К примеру, моноклональные антитела, которые будут приме-

няться согласно данному изобретению, можно получить с помощью различных способов, включая гибридную технологию (например, Kohler и Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14(3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>nd</sup> ed. 1988); Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), технологии рекомбинантных ДНК (см., например, в патенте США № 4816567), технологии фаговых дисплеев (см., например, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 101(34):12467-12472 (2004); и Lee et al., *J. Immunol. Methods*, 284(1-2): (2004) и технологии продуцирования антител человека или аналогов антител человека в организмах животных, которые частично или полностью содержат локусы или гены иммуноглобулинов человека, кодирующие последовательности иммуноглобулинов человека (см., например, WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 91/10741; Jakobovits et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); в патенте США № 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; и 5661016; Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996); и Lonberg и Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995).

Термин "голое антитело" относится к антителу, которое не конъюгировано с цитотоксическим фрагментом или радиоактивной меткой.

Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" или "целое антитело" в данном документе являются взаимозаменяемыми и относятся к антителу по существу в его интактной форме, в отличие от фрагмента антитела. В частности, полноразмерные четырехцепочечные антитела включают в себя такие антитела, которые имеют тяжелую и легкую цепи, включая Fc-область. Полноразмерные антитела только с тяжелой цепью включают в себя тяжелую цепь (такую как V<sub>H</sub>H) и Fc-область. Константные домены могут быть константными доменами нативных последовательностей (например, константные домены нативных последовательностей человека) или их вариантами аминокислотных последовательностей. В некоторых случаях интактное антитело может иметь одну или большее количество эффекторных функций.

"Фрагмент антитела" содержит часть интактного антитела, предпочтительно антигенсвязывающий и/или переменный участок интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают в себя Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub> и Fv-фрагменты; диатела; линейные антитела (см. в патенте США № 5641870, Пример 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 [1995]); молекулы одноцепочечных антител; однодоменные антитела (такие как V<sub>H</sub>H) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. При расщеплении антител папаином образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемые "Fab"-фрагментами, и остаточный "Fc"-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Fab-фрагмент состоит из целой L-цепи вместе с доменом переменной области H-цепи (V<sub>H</sub>) и первым константным доменом из одной тяжелой цепи (C<sub>H</sub>1). Каждый Fab-фрагмент является моновалентным относительно связывания антигена, т.е. он имеет один антигенсвязывающий участок. Обработка антитела пепсином позволяет получить один большой F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, который условно соответствует двум дисульфидносвязанным Fab-фрагментам, имеющим различную антигенсвязывающую активность и по-прежнему способным к перекрестному связыванию антигена. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов тем, что имеют несколько дополнительных остатков на карбоксильном конце домена C<sub>H</sub>1, включая в себя один или большее количество цистеинов из шарнирного участка антитела. В данном описании Fab'-SH представляет собой обозначение Fab', в котором цистеиновый(е) остаток(и) константных доменов несет свободную тиольную группу. F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты антитела первоначально получали в виде пар Fab'-фрагментов, между которыми находятся шарнирные остатки цистеина. Известны также другие варианты химического связывания фрагментов антител.

Fc-фрагмент содержит карбокситерминальные части обеих H-цепей, удерживаемых вместе дисульфидными связями. Эффекторные функции антител определяются по последовательностям в Fc-области; эта область также является областью, распознаваемой Fc-рецепторами (FcR), обнаруженными на определенных типах клеток.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, содержащий полный антигенраспознающий и антигенсвязывающий участок. Этот фрагмент состоит из димера одного домена переменной области тяжелой цепи и одного домена переменной области легкой цепи, соединенных жесткой нековалентной связью. В результате фолдинга этих двух доменов выделяется шесть гипервариабельных петель (по три петли из каждой H- и L-цепи), которые обеспечивают наличие аминокислотных остатков для связывания антигенов и придают антителу антигенсвязывающую специфичность. В то же время даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфических по отношению к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем полный участок связывания.

"Одноцепочечные Fv", также имеющие аббревиатуру "sFv" или "scFv", представляют собой фрагменты антител, которые содержат домены антител V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, связанные в одну полипептидную цепь.

Предпочтительно полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами  $V_H$  и  $V_L$ , которые дают возможность scFv образовывать требуемую структуру для связывания антигенов. Для обзора sFv см. публикацию Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315 (1994).

"Функциональные фрагменты" описанных в данном документе антител содержат часть интактного антитела, обычно включающую антигенсвязывающую или варибельную область интактного антитела или Fc-область антитела, которая сохраняет или модифицирует способность связывания FcR. Примеры фрагментов антител включают в себя линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин "диатела" относится к малым фрагментам антител, полученным в результате конструирования sFv-фрагментов (см. предыдущий абзац) с короткими линкерами (около 5-10 остатков) между доменами  $V_H$  и  $V_L$ , с целью обеспечения спаривания V-доменов между цепями, но не внутри цепей, в результате чего образуется двухвалентный фрагмент, т.е. фрагмент, имеющий два антигенсвязывающих участка. Биспецифические антитела представляют собой гетеродимеры двух "кроссоверных" sFv-фрагментов, в которых домены  $V_H$  и  $V_L$  двух антител представлены на разных полипептидных цепях. Диатела описаны более подробно, например, в EP 404097; WO 93/11161; Hollinger et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Моноклональные антитела в данном документе, в частности, включают в себя "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител конкретного вида животных или антител, принадлежащих к конкретному классу или подклассу, в то время как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител другого вида животных или антител, принадлежащих к другому классу или подклассу, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность (описано в патенте США № 4816567; Morrison et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие интерес, включают в себя антитела PRIMATTZFD®, в которых антигенсвязывающая область антитела происходит от антител, полученных, например, путем иммунизации обезьян макаков антигеном, представляющим интерес. В данном контексте термин "гуманизированное антитело" применяется для обозначения подмножества "химерных антител".

"Гуманизированные" формы антител нечеловеческого происхождения (например, верблюда) представляют собой химерные антитела, содержащие минимальные последовательности, полученные из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения гуманизированное антитело представляет собой иммуноглобулин человека (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR реципиента (описанные далее) заменяют остатками из HVR видов нечеловеческого происхождения (донорское антитело), например мыши, крысы, кролика или нечеловекообразного примата, при этом антитело обладает желательной специфичностью, аффинностью и/или активностью. В некоторых случаях каркасные ("FR") остатки иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, отсутствующие в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации можно осуществить для дальнейшего уточнения характеристик антител, таких как аффинность связывания. Как правило, гуманизированное антитело содержит по существу все или по меньшей мере один, а обычно два варибельных домена, в которых все или по существу все гиперварибельные петли соответствуют гиперварибельным петлям последовательности иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все FR-области представляют собой такие области, которые относятся к последовательности иммуноглобулина человека, тем не менее FR-области могут включать в себя одну или большее количество замен отдельных FR-остатков, что улучшает характеристики антител, такие как аффинность связывания, изомеризация, иммуногенность и т.д. Количество этих аминокислотных замен в FR обычно не превышает 6 в H-цепи, а в L-цепи - не более 3. В некоторых случаях гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации см., например, Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Кроме того, см., например, Vaswani и Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions*, 23:1035-1038 (1995); Hurler и Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); и в патентах США № 6982321 и 7087409.

"Антитело человека" представляет собой антитело, обладающее аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности антитела, продуцированного в организме человека и/или полученного с помощью любой методики получения антител человека, описанных в данном документе. Это определение антитела человека, в частности, не включает гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки нечеловеческого происхождения. Антитела человека можно получить с помощью различных методик, известных в данной области техники, включая библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom и Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Также

для получения моноклональных антител человека доступны способы, описанные в Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). См. также van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5:368-74 (2001). Антитела человека можно получить путем введения антигена в организм трансгенного животного, модифицированного с целью продукции таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, при этом эндогенные локусы указанного животного отключены, например иммунизированных ксеномышей (см., например, в патентах США № 6075181 и 6150584 относительно технологии XENOMOUSE™). См. также, например, Li et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) относительно антител человека, полученных с помощью технологии В-клеточной гибридомы человека.

В данном контексте термин "гипервариабельная область", "HVR" или "HV" относится к областям вариабельного домена антитела, которые характеризуются гипервариабельностью последовательностей и/или образуют структурно определенные петли. Как правило, однодоменные антитела содержат три HVR (или CDR): HVR1 (или CDR1), HVR2 (или CDR2) и HVR3 (или CDR3). HVR3 отображает наибольшее разнообразие трех HVR и, как полагают, играет уникальную роль в придании тонкой специфичности антителам. См., например, Hamers-Casterman et al., *Nature*, 363:446-448 (1993); Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Термин "определяющая комплементарность область" или "CDR" применяется для обозначения гипервариабельных областей, определенных системой Kabat. См. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)

Существует ряд определений HVR, охватываемых данным изобретением. Определяющие комплементарность области (CDR) по Kabat основаны на вариабельности последовательностей и являются наиболее часто применяемыми (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Вместо этого, Chothia обращает внимание на локализацию структурных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). AbV HVR представляют собой компромисс между CDR по Kabat и структурными петлями по Chothia и применяются в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. "Контактные" HVR основаны на анализе доступных сложных кристаллических структур. Остатки из каждой из этих HVR отмечены в табл. 1.

Таблица 1

Петля	Определения HVR			
	Kabat	AbM	Chothia	Контакт
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Нумерация по Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Нумерация по Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

HVR могут содержать "расширенные HVR", представленные ниже: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 или 89-96 (L3) в  $V_L$  и 26-35 (H1), 50-65 или 49-65 (H2), и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в  $V_H$ . Для каждого из этих определений остатки в вариабельных доменах нумеруются по Kabat et al., выше.

Аминокислотные остатки однодоменного антитела (такие как  $V_HH$ ) нумеруются согласно общей нумерации для доменов  $V_H$  по Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, Md. publication No. 91), применительно к доменам  $V_HH$  от представителей семейства верблюдовых в статье Riechmann и Muylldermans, *J. Immunol. Methods*, 2000 Jun. 23; 240(1-2):185-195. Согласно этой нумерации FR1  $V_HH$  содержит аминокислотные остатки в положениях 1-30, CDR1  $V_HH$  содержит аминокислотные остатки в положениях 31-35, FR2  $V_HH$  содержит аминокислотные остатки в положениях 36-49, CDR2  $V_HH$  содержит аминокислотные остатки в положениях 50-65, FR3  $V_HH$  содержит аминокислотные остатки в положениях 66-94, CDR3  $V_HH$  содержит аминокислотные остатки в положениях 95-102 и FR4  $V_HH$  содержит аминокислотные остатки в положениях 103-113. В этом отношении следует отметить, что, как хорошо известно в данной области техники для доменов  $V_H$  и для доменов  $V_HH$ , общее количество аминокислотных остатков в каждой из CDR может варьироваться и мо-

жет не соответствовать общему количеству аминокислотных остатков, обозначенных согласно нумерации Kabat (т.е. одно или большее количество положений согласно нумерации Kabat не обязательно могут быть заняты в конкретной последовательности, или конкретная последовательность может содержать больше аминокислотных остатков, чем количество, допустимое нумерацией Kabat).

Выражения "нумерация остатков варибельного домена по Kabat" или "нумерация положений аминокислот по Kabat" и их варианты относятся к системе нумерации, применяемой для варибельных доменов тяжелой или легкой цепи согласно представлению об антителах в публикации Kabat et al., выше. При применении этой системы нумерации конкретная линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорачиванию или вставке в FR или HVR варибельного домена. Например, варибельный домен тяжелой цепи может содержать вставку одной аминокислоты (остаток 52A согласно Kabat) после остатка 52 в H2 и вставленные остатки (например, остатки 82A, 82b и 82c и т. д. согласно Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерацию остатков по Kabat можно определить для данного антитела путем выравнивания областей гомологии последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, пронумерованной по Kabat.

Если не указано иное, нумерация остатков в тяжелой цепи иммуноглобулина соответствует нумерации индекса ЕС согласно Kabat et al., выше. "Индекс EU согласно Kabat" относится к нумерации остатков антитела IgG1 EU человека.

"Каркасные" или "FR"-остатки представляют собой остатки варибельного домена, не являющиеся остатками HVR, согласно определению в данном документе.

"Человеческий консенсусный каркас" или "человеческий акцепторный каркас" является структурой, которая представляет собой наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в отборе каркасных последовательностей  $V_L$  или  $V_H$  иммуноглобулина человека. Обычно отбор последовательностей  $V_L$  или  $V_H$  иммуноглобулина человека осуществляют из подгруппы последовательностей варибельного домена. Как правило, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу, как описано в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). В случае  $V_L$  примеры включают в себя подгруппу, которая может быть подгруппой каппа I, каппа II, каппа III или каппа IV, как описано в Kabat et al., выше. Кроме того, в случае  $V_H$ , подгруппа может быть подгруппой I, подгруппой II или подгруппой III, как описано в Kabat et al. В альтернативном варианте, человеческий консенсусный каркас может быть получен из вышеописанных конкретных остатков, например, когда человеческий каркасный остаток выбирают на основе его гомологии с донорским каркасом путем выравнивания последовательности донорского каркаса с набором различных последовательностей человеческого каркаса. Акцепторный человеческий каркас, "полученный из" каркаса иммуноглобулина человека или человеческого консенсусного каркаса, может иметь такую же аминокислотную последовательность или может содержать ранее существовавшие изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения количество ранее существовавших аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее.

"Аминокислотная модификация" в заданном положении, например Fc-области, относится к замене или делеции указанного остатка или вставке по меньшей мере одного аминокислотного остатка, смежного с указанным остатком. Термин "вставка, смежная с указанным остатком" означает вставку в пределах одного-двух остатков. Вставка может быть N-концевой или C-концевой относительно указанного остатка. Предпочтительная модификация аминокислоты в данном изобретении представляет собой замену.

Антитело "с созревшей аффинностью" представляет собой антитело, содержащее одно или большее количество изменений в одной или большем количестве HVR, приводящих к усилению аффинности антитела к антигену по сравнению с исходным антителом, не содержащим указанного(ых) изменения(ий). В одном варианте осуществления данного изобретения антитело с созревшей аффинностью характеризуется наномолярными или даже пикомолярными значениями аффинности к антигену-мишени. Антитела с созревшей аффинностью можно получить с помощью различных методик, известных в данной области техники. Например, Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992) описывает созревание аффинности при и перетасовке доменов  $V_H$  и  $V_L$ . Случайный мутагенез HVR и/или каркасных остатков описан, например, в Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA*, 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene*, 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); и Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

В данном контексте термины "специфически связывается", "специфически распознается" или "специфический для" относятся к измеряемым и воспроизводимым взаимодействиям, таким как связывание между мишенью и антигенсвязывающим белком (таким как CAR или sdAb), которое является определяющим для подтверждения факта наличия мишени при наличии гетерогенной популяции молекул, включая биологические молекулы. Например, антигенсвязывающий белок (такой как CAR или sdAb), который специфически связывает мишень (которая может быть эпитопом), представляет собой антигенсвязывающий белок (такой как CAR или sdAb), который связывает эту мишень с большей аффинностью, авидностью, легкостью и/или продолжительностью по сравнению с другими мишенями. В некоторых

вариантах осуществления данного изобретения степень связывания антигенсвязывающего белка (такого как CAR или sdAb) с несвязанной мишенью составляет менее чем около 10% связывания антигенсвязывающего белка (такого как CAR или sdAb) с указанной мишенью, что измеряется, например, с помощью радиоиммуноанализа (RIA). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антигенсвязывающий белок (такой как CAR или sdAb), который специфически связывает мишень, имеет константу диссоциации ( $K_d$ )  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$ ,  $\leq 10$ ,  $\leq 1$  или  $\leq 0,1$  нМ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антигенсвязывающий белок (такой как CAR или sdAb) специфически связывает эпитоп на белке, который является консервативным среди белка от разных видов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения специфическое связывание может включать в себя, но не требует исключительного связывания.

Термин "специфичность" относится к селективному распознаванию антигенсвязывающего белка (такого как CAR или sdAb) для конкретного эпитопа антигена. Естественные антитела, например, являются моноспецифическими. В данном контексте термин "мультиспецифический" означает, что антигенсвязывающий белок (такой как CAR или sdAb) имеет два или большее количество антигенсвязывающих участков, из которых по меньшей мере два связывают другой антиген или другой эпитоп того же антигена. В данном контексте термин "биспецифический" означает, что антигенсвязывающий белок (такой как CAR или sdAb) характеризуется двумя различными антигенсвязывающими специфичностями. В данном контексте термин "моноспецифический" CAR означает антигенсвязывающий белок (такой как CAR или sdAb), который имеет один или большее количество участков связывания, каждый из которых связывает один и тот же эпитоп одного и того же антигена.

В данном контексте термин "валентность" означает наличие определенного количества участков связывания в антигенсвязывающем белке (таком как CAR или sdAb). Естественное антитело, например, или полноразмерное антитело, имеет два связывающих участка и является двухвалентным. Таким образом, термины "трехвалентный", "четырёхвалентный", "пятивалентный" и "шестивалентный" указывают на наличие двух участков связывания, трех участков связывания, четырех участков связывания, пяти участков связывания и шести участков связывания соответственно в антигенсвязывающем белке (например, CAR или sdAb).

"Эффекторные функции антитела" относятся к биологическим видам активности, присущим Fc-области (Fc-область с нативной последовательностью или вариант аминокислотной последовательности Fc-области) антитела, и изменяются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают в себя связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; подавление рецепторов поверхности клетки (например, рецепторов В-клеток); и активацию В-клеток. "Сниженная или минимизированная" эффекторная функция антитела означает, что функция снижена по меньшей мере на 50% (в альтернативном варианте 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99%) по сравнению с антителом дикого типа или немодифицированным антителом. Эффекторную функцию антитела легко может определить и измерить специалист в данной области техники. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения воздействуют на эффекторные функции антитела относительно связывания комплемента, функции комплементзависимой цитотоксичности и антителозависимой цитотоксичности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторная функция устраняется посредством мутации в константной области, которая устраняет гликозилирование, например, "мутация без эффектора". В одном аспекте мутация без эффектора представляет собой мутацию N297A или DANA (D265A + N297A) в области C<sub>H</sub>2. Shields et al., J. Biol. Chem. 276(9):6591-6604 (2001). В альтернативном варианте дополнительные мутации, приводящие к уменьшению или устранению эффекторной функции, включают в себя K322A и L234A/L235A (LALA). В альтернативном варианте эффекторную функцию можно уменьшить или устранить с помощью методов продуцирования, таких как экспрессия в клетках-хозяевах, которая при отсутствии гликозилирования (например, E. coli.) или в результате измененного профиля гликозилирования является неэффективной или менее эффективной при повышении эффекторной функции (например, Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278(5):3466-3473 (2003)).

"Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или ADCC относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig связывается с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на некоторых цитотоксических клетках (например, клетки естественные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), позволяя этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с антигенсодержащей клеткой-мишенью и впоследствии убивать клетку-мишень цитотоксинами. Антитела "вооружают" цитотоксические клетки и необходимы для уничтожения клетки-мишени с помощью этого механизма. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Сводная информация об экспрессии Fc на гемопозитических клетках приведена в табл. 3 на странице 464 публикации Ravetch и Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Для оценки активности ADCC молекулы, представляющей интерес, можно провести анализ ADCC in vitro, такой как описанный в патенте США № 5500362 или 5821337. В качестве эффекторных клеток в таких анализах можно применять мононуклеарные клетки периферической крови

(МКПК) и клетки-натуральные киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте активность ADCC молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, на модели животного, такой как описано в публикации Clynes et al., PNAS USA, 95:652-656 (1998).

В данном контексте термин "Fc-область" применяется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc-области нативной последовательности и варианты Fc-областей. Несмотря на то, что границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как растянутая из аминокислотного остатка в положении Cys226 или из Pro230 по направлению к ее карбоксильному концу. C-концевой лизин (остаток 447 согласно системы нумерации EU) Fc-области можно удалить, например, во время продуцирования или очистки антитела или посредством рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь указанного антитела. Соответственно, композиция интактных антител может содержать популяции антител с удаленными остатками K447, популяции антител без удаленных остатков K447 и популяции антител, имеющие смесь антител с остатком K447 и без него. Пригодные Fc-области с нативными последовательностями для применения в антителах, описанных в данном документе, включают в себя IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B) IgG, IgG3 и IgG4.

Как правило, термин "аффинность связывания" относится к силе суммы нековалентных взаимодействий между одним участком связывания молекулы (например, антитела или CAR) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в данном документе "аффинность связывания" относится к присущей молекуле аффинности связывания, отражающей взаимодействие между членами пары связывающихся компонентов (например, антителом и антигеном или CAR и антигеном) при их соотношении 1:1. Аффинность молекулы X к ее партнеру Y, как правило, можно представить в виде константы диссоциации ( $K_d$ ). Аффинность можно измерить с помощью общепринятых способов, известных в данной области техники, в том числе тех, которые описаны в данном документе. Как правило, низкоаффинные антитела связывают антиген медленно и склонны легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела, как правило, связывают антиген быстрее и имеют тенденцию оставаться связанными дольше. В данной области техники известны различные способы измерения аффинности связывания, любой из которых может применяться для целей данного изобретения. Конкретные иллюстративные и типовые варианты осуществления данного изобретения, связанные с измерением аффинности связывания, описаны в данном документе.

"Блокирующее" антитело или "антагонистическое" антитело представляет собой такое антитело, которое ингибирует или уменьшает биологическую активность антигена, с которым оно связывается. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения блокирующие антитела или антагонистические антитела по существу или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

"Агонистическое" или активирующее антитело представляет собой такое антитело, которое усиливает или инициирует передачу сигнала антигеном, с которым оно связывается. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения агонистические антитела обуславливают или активируют передачу сигнала без присутствия природного лиганда.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" или "гомологию" в отношении последовательности пептида, полипептида или антитела определяют как процент аминокислотных остатков последовательности-кандидата, идентичных аминокислотным остаткам специфической пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо для достижения максимального процента идентичности последовательностей, причем при определении идентичности последовательностей консервативные замены не учитываются. Выравнивание аминокислотных последовательностей с целью определения процента их идентичности можно осуществить разными способами, известными специалистам в данной области техники, например, с помощью широко доступного программного обеспечения, такого как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для измерения степени выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания на полной длине подлежащих сравнению последовательностей.

В данном контексте термин "химерный рецептор антигенов" или "CAR" относится к генно-инженерным рецепторам, которые можно применять для прививания одной или большего количества антигенных специфичностей в иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки. Некоторые CAR также известны как "искусственные рецепторы Т-клеток", "химерные рецепторы Т-клеток" или "химерные иммунные рецепторы". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфический для одного или большего количества антигенов (таких как опухолевые антигены), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен Т-клеток и/или другие рецепторы. "CAR-T" относится к Т-клетке, которая экспрессирует CAR.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR или sdAb, описанные в данном документе, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая является идентифицированной и отделена по меньшей мере от одной контаминирующей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в среде, являющейся средой ее продуцирования. Предпочтительно выделенная нуклеи-

новая кислота не связана со всеми компонентами, связанными со средой продуцирования. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды и антитела, описанные в данном документе, находятся в форме, отличающейся от формы или компоновки, в которой она встречается в природе. Таким образом, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты отличаются от нуклеиновой кислоты, существующей в природных условиях в клетках, и кодирующей полипептиды и антитела, описанные в данном документе.

Термин "контрольные последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме хозяина. Контрольные последовательности, которые пригодны для введения в прокариоты, к примеру, включают в себя промотор, в некоторых случаях операторную последовательность и участок связывания рибосом. Известно, что в эукариотических клетках применяются промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", если она вступает в функциональное взаимоотношение с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. К примеру, ДНК предпоследовательности или секреторного лидера является функционально связанной с ДНК полипептида, если она экспрессируется как пребелок, принимающий участие в секреции этого полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию этой последовательности, или участок связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы оптимизировать процесс трансляции. В целом, "функционально связанный" означает, что последовательности ДНК, будучи связанными, являются непрерывными и, в случае наличия секреторного лидера, непрерывными и в фазе считывания. Тем не менее энхансеры не должны быть непрерывными. Связывание сопровождается лигированием по подходящим участкам рестрикции. Если таких участков нет, то в соответствии с подходящей методикой применяются синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

В данном контексте термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной обеспечивать репродукцию другой, связанной с ней нуклеиновой кислоты. Термин включает вектор, находящийся в виде самореплицирующейся нуклеиновой кислоты, а также вектор, способный внедряться в геном клетки-хозяина, в которую его вводят. Некоторые векторы способны управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они находятся в функциональной связи. Такие векторы в данном документе называют "экспрессирующими векторами".

В данном контексте термин "аутологичный" предназначен для обозначения любого материала, полученного от того же индивидуума, которому позднее этот материал будет повторно введен.

Термин "аллогенный" относится к трансплантату, полученному от другого индивидуума того же вида.

В данном контексте термин "трансфицированный", или "трансформированный", или "трансдуцированный" относится к способу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. "Трансфицированная", или "трансформированная", или "трансдуцированная" клетка представляет собой трансфицированную, трансформированную или трансдуцированную экзогенную нуклеиновую кислоту. Клетка включает в себя первичную оригинальную клетку и ее потомство.

В данном контексте выражения "клетка", "линия клеток" и "культура клеток" применяются взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают в себя потомство. Таким образом, слова "трансфектанты" и "трансфицированные клетки" включают в себя первичную оригинальную клетку и полученные из нее культуры, независимо от количества пассажей. Также понятно, что все потомство не может быть точно идентичным по содержанию ДНК из-за преднамеренных или непреднамеренных мутаций. В объем данного описания входит вариант потомства, полученный путем скрининга, который обладает такой же функцией или биологической активностью, что и исходно трансформированная клетка.

Термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" в данном документе применяются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают в себя "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают в себя первично трансформированные клетки и полученное из них потомство, независимо от числа пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным родительской клетке по содержанию нуклеиновых кислот и может содержать мутации. В объем данного описания входит мутантное потомство, полученное путем скрининга или отбора, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, как и исходно трансформированная клетка.

В данном контексте термин "лечение" или "воздействие" представляет собой подход для получения полезных или желаемых результатов, включая в себя клинические результаты. Для целей данного изобретения полезные или желаемые клинические результаты включают в себя одно или большее количество из следующих явлений, но не ограничиваются ими: облегчение одного или большего количества симптомов, вызванных заболеванием, уменьшение степени тяжести заболевания, стабилизация заболевания (например, предотвращение или замедление ухудшения заболевания), предотвращение или замедление распространения (например, метастазирования) заболевания, предотвращение или замедление развития рецидива заболевания, замедление или задержку прогрессирования заболевания, уменьшение интенсив-

ности заболевания, достижение ремиссии (частичной или полной) заболевания, уменьшение дозы одного или большего количества других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, задержку прогрессирования заболевания, повышения качества жизни и/или продление выживания. Термин "лечение" также относится к снижению выраженности патологических последствий рака. Способы по данному изобретению предполагают один или большее количество из этих аспектов лечения.

В данном контексте термин "индивидуум" или "субъект" относится к млекопитающему, включая в себя, но не ограничиваясь ими, человека, быка, лошадь, представителя кошачьих, собаку, грызуна или примата. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум представляет собой человека.

В данном контексте термин "эффективное количество" относится к количеству агента, такого как однодоменное антитело, сконструированная иммунная эффекторная клетка или его фармацевтической композиции, достаточному для лечения определенного нарушения, патологического состояния или заболевания, например, достигая улучшения, ослабления, уменьшения интенсивности и/или задержки развития одного или большего количества симптомов. В отношении рака, эффективное количество включает количество, достаточное для того, чтобы вызвать сокращение объема опухоли и/или уменьшить скорость роста опухоли (например, для подавления роста опухоли) или предотвратить или задержать другую нежелательную пролиферацию клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффективное количество представляет собой количество, достаточное для задержки развития. В некоторых вариантах реализации эффективное количество представляет собой количество, достаточное для предупреждения или задержки развития рецидива. Эффективное количество может быть введено за одно или большее количество введений. Эффективное количество лекарственного средства или композиции может (i) снижать количество раковых клеток; (ii) уменьшать размер опухоли; (iii) ингибировать, задерживать, замедлять до некоторой степени и, предпочтительно, останавливать инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) ингибировать (т.е. замедлять до некоторой степени и, предпочтительно, останавливать) метастазирование опухоли; (v) ингибировать рост опухоли; (vi) предупреждать или задерживать возникновение и/или развитие рецидива опухоли и/или (vii) облегчать до некоторой степени один или большее количество симптомов, ассоциированных с раком.

Термин "адьювантные условия" относится к клинической ситуации, при которой индивидуум имел рак, в анамнезе, и, как правило (но не обязательно), отвечал на терапию, которая включала, но не ограничивалась этим, хирургическое вмешательство (например, хирургическую резекцию), лучевую терапию и химиотерапию. Однако из-за наличия в их анамнезе рака, эти индивидуумы расцениваются как подверженные риску развития заболевания. Лечение или введение в "адьювантных условиях" относится к очередному режиму лечения. Степень риска (например, когда индивидуум в адьювантных условиях расценивается как подверженный "высокому риску" или "низкому риску") зависит от нескольких факторов, чаще всего от степени тяжести заболевания при первом лечении.

Термин "неоадьювантные условия" относится к клинической ситуации, при которой способ осуществляют до первичной/окончательной терапии.

В данном контексте термин "задержка" развития рака означает откладывание, препятствование, замедление, стабилизацию и/или отсрочку развития заболевания. Эта задержка может быть разной продолжительности времени, в зависимости от анамнеза заболевания и/или индивидуума, который получает лечение. Как очевидно специалисту в данной области техники, достаточная или значительная задержка может, по сути, включать в себя предотвращение, поскольку заболевание у индивидуума не развивается. Способ, который "задерживает" развитие рака представляет собой способ, который уменьшает вероятность развития заболевания в данном временном интервале и/или уменьшает степень заболевания в данном временном интервале по сравнению с неприменением способа. Как правило, такие сравнения основываются на клинических исследованиях с включением статистически значимого числа индивидуумов. Развитие рака можно обнаружить с помощью стандартных методов, включая, но не ограничиваясь ими, компьютерную аксиальную томографию (CAT Scan), магнитно-резонансную томографию (МРТ), абдоминальное ультразвуковое исследование, тесты на свертывание крови, ангиографию или биопсию. Развитие может также относиться к прогрессированию рака, который может быть первоначально необнаруживаемым, и включает возникновение, рецидив и первые проявления.

Термин "фармацевтический состав" относится к препарату, представленному в форме, обеспечивающей эффективность биологической активности активного ингредиента, и не содержащему дополнительных компонентов, обладающих неприемлемой токсичностью для субъекта, которому следует вводить состав. Такие составы являются стерильными. "Стерильный" состав является асептическим или не содержащим каких-либо живых микроорганизмов и их спор.

В данном контексте термин "носители" включают в себя фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, которые нетоксичны для клетки или млекопитающих, подвергающихся их воздействию при применяемых дозах и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный pH-буферизирующий раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают в себя буферы, например, на основе фосфорной, лимонной и других органических кислот; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты

(такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид; бензетония хлорид; феноловый, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низко молекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающие глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Предложенный в данном документе термин "разбавитель" означает фармацевтически приемлемый (безопасный и нетоксичный для введения человеку) и пригодный для приготовления жидкой композиции, такой как композиция, восстановленная после лиофилизации. Примеры разбавителей включают в себя стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферизирующий раствор (например, забуференный фосфатом физиологический раствор), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. В альтернативном варианте осуществления данного изобретения разбавители могут включать в себя водные растворы солей и/или буферов.

"Консервант" представляет собой соединение, которое может быть добавлено к составам, описанным в данном документе, для снижения активности бактерий. Добавление консерванта может, например, способствовать получению состава многоразового применения (многодозового состава). Примеры потенциальных консервантов включают в себя хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония (смесь хлоридов алкилбензилдиметиламмония, в которых алкильные группы представляют собой соединения с длинной цепью) и хлорид бензетония. Другие типы консервантов включают в себя ароматические спирты, такие как фенол, бутил и бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол. Наиболее предпочтительным консервантом в данном изобретении является бензиловый спирт.

"Стабильный" состав представляет собой состав, в котором белок по существу сохраняет свою физическую и химическую стабильность и целостность при хранении. Различные аналитические методы для измерения стабильности белка доступны в данной области техники и рассматриваются в публикации Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993). Стабильность можно измерить при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Для быстрого скрининга состав можно выдерживать при 40°C в течение периода времени от 2 недель до 1 месяца, после чего измерить стабильность. Если состав хранится при температуре 2-8°C, как правило, он должен быть стабильным при температуре 30 или 40°C в течение по меньшей мере 1 месяца и/или должен быть стабильным при температуре 2-8°C в течение по меньшей мере 2 лет, если состав хранится при температуре 30°C, как правило, он должен быть стабильным в течение по меньшей мере 2 лет при температуре 30°C и/или должен быть стабильным при температуре 40°C в течение по меньшей мере 6 месяцев. Например, степень агрегации во время хранения может использоваться в качестве индикатора стабильности белка. Таким образом, "стабильный" состав может быть таким, в котором менее 10%, а предпочтительно менее 5% белка присутствуют в форме единого скопления в составе. В других вариантах осуществления данного изобретения можно определить любую степень увеличения скопления при хранении состава.

"Восстановленный" состав представляет собой состав, который получают путем растворения лиофилизованного белка или препарата антитела в разбавителе, в результате чего белок диспергируется по всему объему. Восстанавливаемый состав является пригодным для введения (например, подкожного введения) пациенту, который должен получать лечение с применением белка, представляющего интерес, и в некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть таким, который является пригодным для парентерального или внутривенного введения.

"Изотонический" состав представляет собой такой состав, который имеет по существу такое же осмотическое давление, что и кровь человека. Изотонические составы обычно имеют осмотическое давление от около 250 до 350 мОсм. Термин "гипотонический" описывает состав с осмотическим давлением, которое является ниже осмотического давления крови человека. Соответственно, термин "гипертонический" применяется для описания состава с осмотическим давлением, которое является выше осмотического давления крови человека. Изотоничность можно измерить, например, с помощью парофазного осмометра или осмометра по точке замерзания. Составы по данному изобретению становятся гипертоническими после добавления соли и/или буфера.

Понятно, что варианты осуществления данного изобретения, описанные в данном документе, включают в себя "состоящие" и/или "состоящие по существу из" вариантов осуществления.

В данном документе ссылка на "около" в отношении значения или параметра включает (и описывает) варианты, которые направлены на это значение или параметр как таковые. Например, описание, ссылаясь на "около X", включает описание "X".

В данном контексте ссылка на "не" в отношении значения или параметра, как правило, означает "кроме" значения или параметра. Например, выражение "указанный способ не применяют для лечения рака типа X" означает, что этот способ не применяют для лечения типов рака, отличных от X.

В данном документе термин "около X-Y" имеет то же значение, что и "от около X до около Y".

При использовании по тексту данного документа и прилагаемой формуле изобретения слова в единственном числе означают также множественное число, если из контекста явно не следует иное.

## II. Однодоменные антитела.

В одном аспекте данного изобретения предлагаются однодоменные антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и антигенсвязывающие белки, содержащие любое из однодоменных антител. Типовые однодоменные антитела приведены в табл. 2.

Таблица 2

Типовые однодоменные антитела

Ab	Тип. AA SEQ ID	Тип. NA SEQ ID	CDR1	CDR2	CDR3
Типовые однодоменные антитела анти-CD19					
CD19 V <sub>H</sub> H	76	101	INRMG (SEQ ID NO: 1)	SITVRGITNYADSV KG (SEQ ID NO: 2)	VSSNRDPDY (SEQ ID NO: 3)
Типовые однодоменные антитела анти-CD20					
CD20 V <sub>H</sub> H	77	102	IGTMG (SEQ ID NO: 4)	AIRWSTGGTRYAD SVKG (SEQ ID NO: 5)	DRLSLDLSGRYHY NPAVYDY (SEQ ID NO: 6)
Типовые однодоменные антитела анти-BCMA					
269A 37346	78	103	SGFTLDYYAI G (SEQ ID NO: 7)	CISRSDBGSTYYADS VKG (SEQ ID NO: 18)	AGADCSGYLRDYE F (SEQ ID NO: 29)
269A 37348	79	104	SGRTFSTYGM A (SEQ ID NO: 8)	SKASMNYSGRTTY ADSVKG (SEQ ID NO: 19)	AGTGCSTYGCFDA QIIDY (SEQ ID NO: 30)
269A 37917	80	105	SGRTFTMG (SEQ ID NO: 9)	AISLSPTLAYYAES VKG (SEQ ID NO: 20)	ADRSVMSIRPDY (SEQ ID NO: 31)
269A 37355	81	106	SGGIFVINAM G (SEQ ID NO: 10)	SIRGLGRNTYDDS VKG (SEQ ID NO: 21)	VYVTLGGVNRD Y (SEQ ID NO: 32)
269A 37915	82	107	SGRTFSSIVM G (SEQ ID NO: 11)	AIMWNDGITYLQD SVKG (SEQ ID NO: 22)	ASKGRYSEYDY (SEQ ID NO: 33)
269A 37936	83	108	SGFTFDRAVI V (SEQ ID NO: 12)	FIKPSDGTIYIDSL KG (SEQ ID NO: 23)	ASPEDWYTDWID WSIYR (SEQ ID NO: 34)

## 046661

269A 37953	84	109	STYTVNSDV MG (SEQ ID NO: 13)	AIMWNDGITYLQD SVKG (SEQ ID NO: 24)	ASKGRYSEYEY (SEQ ID NO: 35)
269A 37965	85	110	SGATLTNDH MA (SEQ ID NO: 14)	AIDWSGRRTNYAD PVEG (SEQ ID NO: 25)	VLRAWISYDNDY (SEQ ID NO: 36)
269A 37972	86	111	SGGTLSKNTV A (SEQ ID NO: 15)	SITWDGRTTYAD SVKG (SEQ ID NO: 26)	DLGKWPAGPADY (SEQ ID NO: 37)
269A 37353	87	112	SEHTFSSHVM G (SEQ ID NO: 16)	VIGWRDISTSYADS VKG (SEQ ID NO: 27)	ARRIDAADFDS (SEQ ID NO: 38)
269A 37948	88	113	SGRAFSTYFM A (SEQ ID NO: 17)	GIAWSSGSTAYAD SVKG (SEQ ID NO: 28)	SRGIEVEEFGA (SEQ ID NO: 39)
Типовые однодоменные антитела анти-CD38					
38A3 7333	89	114	SGLTFSSYPM M (SEQ ID NO: 40)	RISDSGGYTNYYDD SVKG (SEQ ID NO: 52)	ILGLPT (SEQ ID NO: 64)
38A3 7336	90	115	SGFTFSSNWM Y (SEQ ID NO: 41)	TISTDGRGTYKDD SVKG (SEQ ID NO: 53)	KEPRVLMAYLRNL GDFGS (SEQ ID NO: 65)
38A3 7699	91	116	SGRIFSNAMG (SEQ ID NO: 42)	AISTAGSTNYGDS VKG (SEQ ID NO: 54)	LNFPYVY (SEQ ID NO: 66)
38A3 7331	92	117	SGSIFKVFRVF AMS	SISSGETTTYADSV KG	ADHTFTGDF (SEQ ID NO: 67)

			(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 55)	
38A3 7717	93	118	TGKVFYSYDM G (SEQ ID NO: 44)	EITSSGTTHYDDFV SG (SEQ ID NO: 56)	NHVFVGGSY (SEQ ID NO: 68)
38A3 7719	94	119	SASIFTRLPMG (SEQ ID NO: 45)	GIVPSGRINYADSV KG (SEQ ID NO: 57)	ADTFPLPT (SEQ ID NO: 69)
38A3 7330	95	120	SGRAYATMA (SEQ ID NO: 46)	HLRVSGDTTYTD SVKG (SEQ ID NO: 58)	GPYGILAAARVSN PGNYDY (SEQ ID NO: 70)
38A3 7334	96	121	SGLTFSSYIM G (SEQ ID NO: 47)	EISSGGMTSYADS VKG (SEQ ID NO: 59)	APERGSIWYSRYE YKY (SEQ ID NO: 71)
38A3 7730	97	122	SQGIFTINAM G (SEQ ID NO: 48)	EVSSGGRTDYADS VKG (SEQ ID NO: 60)	VSGWHVFGDRIV (SEQ ID NO: 72)
38A3 7340	98	123	SGRTFSSYAM A (SEQ ID NO: 49)	SISTSGGITDYADS VKG (SEQ ID NO: 61)	ARTWYLRTSLQYD Y (SEQ ID NO: 73)
38A3 7731	99	124	SGTIVSISTMG (SEQ ID NO: 50)	TITRRGRNTYDTS VKG (SEQ ID NO: 62)	AEVQLDIWASAYD Y (SEQ ID NO: 74)
38A3 7326	100	125	SGRTYAMG (SEQ ID NO: 51)	TISGAGNTKYADS VKG (SEQ ID NO: 63)	AGKWFPAANEY (SEQ ID NO: 75)

#### Однодоменные антитела анти-CD19.

В одном аспекте данного изобретения предлагаются выделенные однодоменные антитела, которые специфически связываются с CD19, такими как CD19 человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 модулирует активность CD19. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 является антагонистическим антителом.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD19, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 содержит акцепторный человеческий каркас, например каркас человеческого иммуноглобулина или человеческий консенсусный каркас.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD19, содержащее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три CDR, выбранные из (a) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (b) CDR2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и (c) CDR3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 содержит акцепторный человеческий каркас, например каркас человеческого иммуноглобулина или человеческий консенсусный каркас.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD19, содержащее три CDR, содержащие (a) CDR1, характеризующуюся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1; (b) CDR2, характеризующуюся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с

аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2; и (с) CDR3, характеризующуюся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD19 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CDR, характеризующаяся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но однодоменное антитело анти-CD19, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с CD19. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD19 характеризуется созревшей аффинностью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 содержит акцепторный человеческий каркас, например каркас человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусный каркас.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD19, содержащее три CDR, содержащие (а) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (b) CDR2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и (с) CDR3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD19 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 содержит акцепторный человеческий каркас, например каркас человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусный каркас.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD19, содержащее домен  $V_HH$ , характеризующийся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения последовательность  $V_HH$ , характеризующаяся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но однодоменное антитело анти-CD19, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с CD19. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в общей сложности от 1 до 10 аминокислот заменены, вставлены и/или удалены в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения замены, вставки или делеции встречаются в областях, находящихся за пределами CDR (т.е. в FR). В некоторых случаях однодоменное антитело анти-CD19 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, включая в себя посттрансляционные модификации этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD19 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 содержит акцепторный человеческий каркас, например каркас человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусный каркас.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD19, содержащее домен  $V_HH$ , имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональные эпитопы могут быть картированы с помощью комбинаторного аланинового сканирования. В этом процессе стратегию комбинаторного аланинового сканирования можно применять для идентификации аминокислот в белке CD19, которые необходимы для взаимодействия с однодоменными антителами анти-CD19. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эпитоп представляет собой конформационную и кристаллическую структуру однодоменного антитела анти-CD19, связанного с CD19, которое можно применять для идентификации эпитопов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с тем же самым эпитопом, что и любое из однодоменных антител анти-CD19, описанных в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, связывающееся с тем же эпитопом, что и однодоменное антитело анти-CD19, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD19, конкурируя с любым из описанных в данном документе однодоменных антител анти-CD19. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения конкурентное связывание можно определить с помощью анализа ELISA. Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое

специфически связывается с CD19, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD19, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-CD19 или антигенсвязывающий белок, содержащий любое из однодоменных антител анти-CD19, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD19 представляет собой моноклональное антитело, включая в себя верблюдовое, химерное, гуманизированное или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD19 представляет собой фрагмент антитела, например, фрагмент V<sub>H</sub>H. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD19 представляет собой полноразмерное антитело только с тяжелой цепью, содержащее Fc-область любого класса или изотипа антител, такого как IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах данного изобретения Fc-область ослабляет или минимизирует эффекторную функцию.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD19 (такое как однодоменное антитело анти-CD19) или антигенсвязывающий белок согласно любому из вышеприведенных вариантов осуществления данного изобретения может включать в себя любой из признаков отдельно или в комбинации, как описано в разделах 1-7 "Характеристики антител" ниже.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любое из антител анти-CD19 (например, однодоменные антитела анти-CD19), описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая однодоменное антитело анти-CD19, при этом нуклеиновая кислота содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 101. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 101. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор (например, экспрессирующий вектор), содержащий такую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ получения антитела анти-CD19, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело анти-CD19, как описано выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела анти-CD19, и, в некоторых случаях, извлечение антитела анти-CD19 из клетки-хозяина (или среды, в которой культивируют клетку-хозяина).

Однодоменные антитела анти-CD20.

В одном аспекте данного изобретения предлагаются выделенные однодоменные антитела, которые специфически связываются с CD20, такими как CD20 человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 модулирует активность CD20. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 является антагонистическим антителом.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD20, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 содержит акцепторный человеческий каркас, например каркас человеческого иммуноглобулина или человеческий консенсусный каркас.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD20, содержащее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три CDR, выбранные из (a) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (b) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (c) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 содержит акцепторный человеческий каркас, например каркас человеческого иммуноглобулина или человеческий консенсусный каркас.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD20, содержащее три CDR: (a) CDR1, характеризующуюся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4; (b) CDR2, характеризующуюся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5; и (c) CDR3, характеризующуюся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления дан-

ного изобретения антитело анти-CD20 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CDR, характеризующаяся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но однодоменное антитело анти-CD20, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с CD20. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 характеризуется созревшей аффинностью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 содержит акцепторный человеческий каркас, например каркас человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусный каркас.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD20, содержащее три CDR: (a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (b) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (c) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 является верблюдовым. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 содержит акцепторный человеческий каркас, например каркас человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусный каркас.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD20, содержащее домен  $V_HH$ , характеризующийся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения последовательность  $V_HH$ , характеризующаяся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но однодоменное антитело анти-CD20, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с CD20. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в общей сложности от 1 до 10 аминокислот заменены, вставлены и/или удалены в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения замены, вставки или делеции встречаются в областях, находящихся за пределами CDR (т.е. в FR). В некоторых случаях однодоменное антитело анти-CD20 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, включая в себя посттрансляционные модификации этой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенное однодоменное антитело анти-CD20, содержащее домен  $V_HH$ , имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональные эпитопы могут быть картированы с помощью комбинаторного аланинового сканирования. В этом процессе стратегию комбинаторного аланинового сканирования можно применять для идентификации аминокислот в белке CD20, которые необходимы для взаимодействия с однодоменными антителами анти-CD20. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эпитоп представляет собой конформационную и кристаллическую структуру однодоменного антитела анти-CD20, связанного с CD20, которое можно применять для идентификации эпитопов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с тем же самым эпитопом, что и любое из однодоменных антител анти-CD20, описанных в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, связывающееся с тем же эпитопом, что и однодоменное антитело анти-CD20, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-CD20 или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD20, конкурируя с любым из описанных в данном документе однодоменных антител анти-CD20. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения конкурентное связывание можно определить с помощью анализа ELISA. Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с CD20, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD20, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-CD20 или антигенсвязывающий белок, содержащий любое из однодоменных антител анти-CD20, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD20 представляет собой моноклональное антитело, включая в себя верблюдовое, химерное, гуманизированное или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD20 представляет собой фрагмент антитела, например, фрагмент  $V_HH$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD20 представляет собой полноразмерное антитело только с тяжелой цепью, содержащее Fc-область любого класса или изо-

типа антител, такого как IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах данного изобретения Fc-область ослабляет или минимизирует эффекторную функцию.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD20 (такое как однодоменное антитело анти-CD20) или антигенсвязывающий белок согласно любому из вышеприведенных вариантов осуществления данного изобретения может включать в себя любой из признаков отдельно или в комбинации, как описано в разделах 1-7 "Характеристики антител" ниже.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любое из антител анти-CD20 (например, однодоменные антитела анти-CD20), описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая однодоменное антитело анти-CD20, при этом нуклеиновая кислота содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 102. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 102. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор (например, экспрессирующий вектор), содержащий такую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ получения антитела анти-CD20, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело анти-CD20, как описано выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела анти-CD20, и в некоторых случаях извлечение антитела анти-CD20 из клетки-хозяина (или среды, в которой культивируют клетку-хозяина).

Однодоменные антитела анти-BCMA.

В одном аспекте данного изобретения предлагаются выделенные однодоменные антитела, которые специфически связываются с BCMA, такими как BCMA человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-BCMA модулирует активность BCMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-BCMA является антагонистическим антителом.

В-клеточный зрелый антиген (BCMA), также известный как CD269, является членом надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей, а именно TNFRSF17 (Thompson et al., *J. Exp. Medicine*, 192(1):129-135, 2000). BCMA человека практически исключительно экспрессируется в клетках плазмы и клетках множественной миеломы (см., например, Novak et al., *Blood*, 103(2):689-694, 2004; Neri et al., *Clinical Cancer Research*, 7(19):5903-5909; Felix et al., *Mol. Oncology*, 9(7):1348-58, 2015). BCMA может связывать активирующий фактор В-клеток (BAFF) и лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL) (например, Mackay et al., 2003 and Kalled et al., *Immunological Review*, 204:43-54, 2005). BCMA может быть подходящей опухолевой антигенной мишенью для иммунотерапевтических агентов при лечении множественной миеломы. Антитела с высокой аффинностью могут блокировать связывание BCMA и его нативными лигандами BAFF и APRIL. Однодоменные антитела анти-BCMA можно применять в комбинации с клеточной иммунотерапией с применением CAR-T-клеток, например, для усиления цитотоксических эффектов, направленных против опухолевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-BCMA, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-BCMA, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-BCMA, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-BCMA, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 81. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-BCMA, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-BCMA, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-BCMA, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-BCMA, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-BCMA, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-BCMA, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-BCMA, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности









руя с однодоменным антителом анти-BCMA, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с BCMA, конкурируя с однодоменным антителом анти-BCMA, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-BCMA или антигенсвязывающий белок, содержащий любое из однодоменных антител анти-BCMA, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-BCMA представляет собой моноклональное антитело, включая в себя верблюдовое, химерное, гуманизованное или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-BCMA представляет собой фрагмент антитела, например, фрагмент V<sub>H</sub>H. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-BCMA представляет собой полноразмерное антитело только с тяжелой цепью, содержащее Fc-область любого класса или изотипа антител, такого как IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах данного изобретения Fc-область ослабляет или минимизирует эффекторную функцию.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-BCMA (такое как однодоменное антитело анти-BCMA) или антигенсвязывающий белок согласно любому из вышеприведенных вариантов осуществления данного изобретения может включать в себя любой из признаков отдельно или в комбинации, как описано в разделах 1-7 "Характеристики антител" ниже.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любое из антител анти-BCMA (например, однодоменные антитела анти-BCMA), описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая однодоменное антитело анти-BCMA, при этом нуклеиновая кислота содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 103-113. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 103-113. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор (например, экспрессирующий вектор), содержащий такую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ получения антитела анти-BCMA, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело анти-BCMA, как описано выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела анти-BCMA, и, в некоторых случаях, извлечение антитела анти-BCMA из клетки-хозяина (или среды, в которой культивируют клетку-хозяина).

Однодоменные антитела анти-CD38.

В одном аспекте данного изобретения предлагаются выделенные однодоменные антитела, которые специфически связываются с CD38, такими как CD38 человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD38 модулирует активность CD38. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD38 является антагонистическим антителом.

CD38 представляет собой трансмембранный гликопротеин типа II, ассоциированный с рецепторами клеточной поверхности, который регулирует приток цитоплазматического Ca<sup>2+</sup> и опосредует передачу сигнала в лимфоидных и миелоидных тканях (Konopleva et al., J. Immunol., 161:4702-8, 1998; Deaglio et al., Blood, 109:5390-8, 2007). CD38 человека сильно и равномерно экспрессируется на клетках миеломы, и в тоже время экспрессируется в относительно низких уровнях на нормальных лимфоидных и миелоидных клетках и в некоторых тканях негемопоэтического происхождения, что делает его потенциальной мишенью при лечении миеломы (см., например, Lin et al., Am. J. ClinPathol., 2004, 121:482; H.M. Lokhorst et al., New Eng. J. Med., 2 015, 373:13).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD38, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD38, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD38, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD38, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD38, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD38, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-









описанных в данном документе однодоменных антител анти-CD38. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения конкурентное связывание можно определить с помощью анализа ELISA. Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с CD38, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD38, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с CD38, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD38, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с CD38, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD38, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с CD38, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD38, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с CD38, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD38, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с CD38, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD38, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с CD38, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD38, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с CD38, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD38, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с CD38, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD38, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с CD38, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD38, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с CD38, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD38, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с CD38, конкурируя с однодоменным антителом анти-CD38, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-CD38 или антигенсвязывающий белок, содержащий любое из однодоменных антител анти-CD38, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD38 представляет собой моноклональное антитело, включая в себя верблюжье, химерное, гуманизованное или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-BCMA представляет собой фрагмент антитела, например, фрагмент V<sub>H</sub>H. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD38 представляет собой полноразмерное антитело только с тяжелой цепью, содержащее Fc-область любого класса или изотипа антител, такого как IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах данного изобретения Fc-область ослабляет или минимизирует эффекторную функцию.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD38 (такое как однодоменное антитело анти-CD38) или антигенсвязывающий белок согласно любому из вышеприведенных вариантов осуществления данного изобретения может включать в себя любой из признаков отдельно или в комбинации, как описано в разделах 1 -7 "Характеристики антител" ниже.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любое из антител анти-CD38 (например, однодоменные антитела анти-CD38), описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая однодоменное антитело анти-CD38, при этом нуклеиновая кислота содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере около 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114-125. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114-125. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор (например, экспрессирующий вектор), содержащий такую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ получения антитела анти-CD38, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело анти-CD38, как описано выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела анти-CD38, и, в некоторых случаях, извлечение антитела анти-CD38 из клетки-хозяина (или среды, в которой культивируют клетку-хозяина).

Характеристики антител.

### 1. Аффинность антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложенное в данном документе антитело имеет константу диссоциации ( $K_d$ )  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$ ,  $\leq 10$ ,  $\leq 1$ ,  $\leq 0,1$ ,  $\leq 0,01$  или  $\leq 0,001$  нМ (например,  $10^{-8}$  М или менее, например, от  $10^{-8}$  до  $10^{-13}$  М, например, от  $10^{-9}$  до  $10^{-13}$  М).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения  $K_d$  измеряют с помощью анализа связывания антигена, меченного радиоактивным изотопом (RIA), с применением Fab-версии или фрагмента  $V_{\text{H}}\text{H}$  представляющего интерес антитела и его антигена согласно описанному ниже анализу. Например, аффинность связывания Fab с антигеном в растворе измеряют путем уравнивания Fab с минимальной концентрацией ( $^{125}\text{I}$ )-меченого антигена в присутствии серии разведений немеченого антигена с последующим захватом связанного антигена на планшете, покрытом антителом анти-Fab (см., например, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Для определения условий анализа многолуночные планшеты MICROTITER® (Thermo Scientific) покрывали в течение ночи улавливающим антителом анти-Fab (Cappel Labs) в концентрации 5 мкг/мл в 50 мМ растворе карбоната натрия (рН 9,6), а затем блокировали 2% (мас./об.) раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение 2-5 ч при комнатной температуре (около 23°C). В планшете, не содержащем адсорбента (Nunc № 269620), смешивали 100 или 26 пМ [ $^{125}\text{I}$ ]-антигена с серийными разведениями Fab, представляющего интерес (например, в соответствии с оценкой антитела к VEGF, Fab-12, описанного в публикации Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Затем Fab, представляющий интерес, инкубировали в течение ночи; в то же время инкубирование могли продолжать в течение более длительного периода (например, около 65 ч) для гарантии достижения равновесия. Затем смесь переносили на планшет для захвата и инкубировали при комнатной температуре (например, в течение часа). Затем раствор удаляли и планшет промывали восемь раз 0,1% полисорбатом-20 (TWEEN-20®) в PBS. После высушивания планшетов добавляли 150 мкл сцинтиллятора MICROSCINT-20™; Packard) на лунку и производили подсчет планшетов на гамма-счетчике TOPCOUNT™ в течение 10 мин. Концентрации каждого Fab, обеспечивавшие связывание, меньшее или равное 20% от максимального, отбирали для применения в конкурентном анализе связывания.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения,  $K_d$  измеряют с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, используя BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Пискатауэй, штат Нью-Джерси) при 25°C с чипами CM5, иммобилизованными антигеном при ~10 единицах ответа (RU). Вкратце, чипы биосенсора с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIAcore, Inc.) активировали N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимидгидрохлоридом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антиген разбавляли 10 мМ раствором ацетата натрия, рН 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) и вводили при скорости потока 5 мкл/мин, достигая около 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После введения антигена вводили 1 М раствор этаноламина для блокирования непрореагировавших групп. Для измерения кинетических параметров двукратные серийные разведения Fab или  $V_{\text{H}}\text{H}$  антитела, представляющего интерес (от 0,78 до 500 нМ), вводили в PBS, содержащий 0,05% полисорбата 20 (TWEEN-20™) в качестве поверхностно-активного вещества (PBST) при 25°C со скоростью потока, составляющей около 25 мкл/мин. Скорости ассоциации ( $k_{\text{on}}$ ) и скорости диссоциации ( $k_{\text{off}}$ ) рассчитывали, используя простую взаимно однозначную модель связывания Ленгмюра (программа для обработки данных (BIACORE®, версия 3.2) путем одновременной подгонки сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации ( $K_d$ ) рассчитывали как отношение  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ . См., например, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Если скорость ассоциации согласно вышеописанному анализу поверхностного плазмонного резонанса превышает  $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , то ее можно определить с помощью методики гашения флуоресценции, измеряющей увеличение или снижение интенсивности испускания флуоресценции (возбуждение = 295 нм; испускание = 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C для 20 нМ раствора антител против антигена (в форме Fab) в PBS, рН 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, измеренных на спектрометре, например, на спектрофотометре с устройством остановки потока (Aviv Instruments) или спектрофотометре SLM-AMINCO™ 8000 серии (ThermoSpectronic) с перемешиваемой кюветой.

### 2. Фрагменты антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложенное в данном описании антитело представляет собой фрагмент антитела. Фрагменты антител включают в себя, но не ограничиваются перечисленным, фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv и scFv,  $V_{\text{H}}\text{H}$ , а также другие фрагменты, описанные ниже. Обзор некоторых фрагментов антител см. в Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Обзор фрагментов scFv см., например, в публикации Pluckthun, в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), p. 269-315 (1994); см также в WO 93/16185 и патентах США № 5571894 и 5587458. Описание Fab- и F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов, содержащих остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации и характеризующихся увеличенным периодом полувыведения in vivo, см. в патенте США № 5869046.

Диатела представляют собой фрагменты антител, содержащие два антигенсвязывающих участка, и могут быть двухвалентными или биспецифическими. См., например, EP 404097; WO 93/01161; Hudson et

al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); и Hollinger et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993). Триатела и тетратела также описаны в публикации Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Фрагменты антител можно получить различными способами, включая протеолитический гидролиз интактного антитела, а также продукцию рекомбинантными клетками-хозяевами (например, *E. coli* или фагом), как описано в данном документе.

### 3. Химерные и гуманизированные антитела.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложенное в данном описании антитело представляет собой химерное антитело. Некоторые химерные антитела описаны, например, в патенте США № 4816567 и Morrison et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). В одном примере химерное антитело содержит переменную область нечеловеческого происхождения (например, переменную область, происходящую от представителей видов верблюдовых, таких как лама) и константную область человека. В еще одном примере химерное антитело представляет собой антитело с "переключенным классом", в котором изменен класс или подкласс по сравнению с родительским антителом. Термин "химерные антитела" включает антигенсвязывающие фрагменты таких антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения химерное антитело является гуманизированным антителом. Как правило, нечеловеческое антитело гуманизируют, чтобы уменьшить иммуногенность для человека и сохранить при этом специфичность и аффинность родительского нечеловеческого антитела. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или большее количество переменных доменов, в которых HVR, например, CDR (или их части) получены из нечеловеческого антитела, а FR (или их части) получены из последовательностей антител человека. В некоторых случаях гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере фрагмент константной области антитела человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения некоторые FR-остатки в гуманизированном антителе заменяют соответствующими остатками антитела нечеловеческого происхождения (например, антитела, из которого получены остатки HVR), например, с целью восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Гуманизированные антитела и способы их получения описаны, например, в публикациях Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), и дополнительно описаны, например, в публикациях Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033 (1989); патентах США № 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri et al., *Methods*, 36:25-34 (2005) (описано прививание SDR ( $\alpha$ -CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 489-498 (1991) (описано "изменение поверхности"); Dall'Acqua et al. *Methods* 36:43-60 (2005) (описана "перетасовка FR") и Osbourn et al., *Methods*, 36:61-68 (2005) и Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (описан подход "управляемого выбора" перетасовки FR).

Каркасные области человека, которые можно применять для гуманизации, включают в себя, но не ограничиваются ими: каркасные области, выбранные с помощью способа "наилучшего соответствия" (см., например, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); каркасные области, происходящие от консенсусной последовательности антител человека конкретной подгруппы переменных областей легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter et al. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); и Presta et al. *J. Immunol.*, 2623 (1993); зрелые (содержащие соматические мутации) каркасные области человека или эмбриональные каркасные области человека (см., например, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 1619-1633 (2008)); и каркасные области, полученные при скрининге библиотек FR (см., например, Vaca et al. *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) и Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменные антитела являются модифицированными, например, гуманизированными, без уменьшения нативной аффинности домена к антигену и со снижением его иммуногенности по отношению к гетерологичным видам. Например, можно определить аминокислотные остатки переменного домена антитела ( $V_HH$ ) из антитела ламы, при этом одна или большее количество аминокислот представителей семейства верблюдовых, например, в каркасных областях заменяются их человеческим аналогом, как было обнаружено в консенсусной последовательности человека, без потери этим полипептидом своих типичных характеристик, т.е. гуманизация не оказывает существенного влияния на антигенсвязывающую способность полученного полипептида. Гуманизация однодоменных антител представителей семейства верблюдовых требует введения и мутагенеза ограниченного количества аминокислот в одной полипептидной цепи. Это контрастирует с гуманизацией scFv, Fab', (Fab')<sub>2</sub> и IgG, при которой требуется введение аминокислотных изменений в две цепи, легкую и тяжелую цепи, и сохранение сборки обеих цепей.

Однодоменные антитела, содержащие домен  $V_HH$ , могут быть гуманизированы с целью получения человекоподобных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения FR области домена  $V_HH$ , описанные в данном документе, содержат по меньшей мере около 50, 60, 70, 80, 90, 95% или более гомологий аминокислотной последовательности с каркасными областями  $V_H$  человека. Один типовой класс гуманизированных доменов  $V_HH$  характеризуется тем, что  $V_HH$  несут аминокислоту из группы, состоящей из глицина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, пролина, фенилаланина, тирозина, триптофана, метионина, серина, треонина, аспарагина или глутамина в положении 45, такого как, например, L45 и триптофана в положении 103, согласно нумерации Kabat. Как таковые, полипепти-

ды, относящиеся к этому классу, характеризуются высокой гомологией аминокислотной последовательности с каркасными областями  $V_H$  человека, при этом указанные полипептиды можно вводить человеку непосредственно без вероятности развития нежелательной иммунной реакции на полипептид и без нагрузки дальнейшей гуманизации.

Другой типовой класс гуманизованных однодоменных верблюдовых антител описан в WO 03/035694 и содержит гидрофобные остатки FR2, как правило, встречающиеся в обычных антителах человеческого происхождения или антителах других видов, при этом потеря гидрофильности компенсируется заряженным остатком аргинина в положении 103, который заменяет консервативный остаток триптофана, присутствующий в  $V_H$  из двухцепочечных антител. Как таковые, пептиды, относящиеся к этим двум классам, характеризуются высокой гомологией аминокислотной последовательности с каркасными областями  $V_H$  человека, при этом указанные пептиды можно вводить человеку непосредственно без вероятности развития нежелательной иммунной реакции на пептид и без нагрузки дальнейшей гуманизации.

#### 4. Человеческие антитела.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложенное в данном документе антитело представляет собой антитело человека. Антитела человека могут быть получены с помощью различных методик, известных в данной области техники. Антитела человека описаны в общих чертах в van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) и Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008). В данной области техники известны трансгенные мыши или крысы, способные продуцировать полностью человеческие однодоменные антитела. См., например, US 20090307787 A1, в патенте США № 8754287, US 20150289489 A1, US 20100122358 A1 и WO 2004/049794.

Антитела человека можно получить путем введения иммуногена трансгенному животному, модифицированному с целью придания ему способности продуцировать интактные антитела или интактные антитела, содержащие варибельные области человека, в ответ на введение антигена. Такие животные обычно содержат все или часть локусов иммуноглобулинов человека, которые заменяют эндогенные локусы иммуноглобулинов, или которые присутствуют вне хромосом, или интегрируются случайным образом в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей эндогенные локусы иммуноглобулинов обычно инактивируются. Обзор способов получения антител человека с использованием трансгенных животных можно см. в Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). См. также, например, в патентах США № 6075181 и 6150584, в которых описана методика XENOMOUSE™; в патенте США № 5770429, в котором описана методика HUMAB®; в патенте США № 7041870, в котором описана методика K-M MOUSE®, и в публикации патентной заявки США № US 2007/0061900, в которой описана методика VELOCIMOUSE®. Варибельные области человека из интактных антител, генерируемых такими животными, можно дополнительно модифицировать, например, путем объединения с другой константной областью человека.

Антитела человека также можно получить с помощью гибридомных способов. Описаны человеческие миеломные и мышино-человеческие гетеромиеломные клеточные линии, применяемые для получения человеческих моноклональных антител. (См., например, Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) и Voerner et al., *J. Immunol.*, 147:86 (1991)). Антитела человека, полученные с помощью технологии на основе В-клеточной гибридомы человека, также описаны в Li et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Дополнительные способы включают в себя описанные, например, в патенте США № 7189826 (в котором описано получение моноклональных человеческих антител IgM из гибридомных клеточных линий) и в публикации Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (в которой описаны полностью человеческие гибридомы). Методика человеческих гибридом (методика Trioma) также описана в Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005), а также в Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 21(3):185-91 (2005).

Антитела человека также можно получить путем выделения Fv-клона последовательностей варибельного домена, выбранных из библиотек фагового дисплея человеческого происхождения. Такие последовательности варибельного домена можно затем объединить с желательным константным доменом человека. Методики отбора антител человека из библиотек антител описаны ниже.

Одна методика для получения последовательностей  $V_HH$ , направленных против конкретного антигена или мишени, включает в себя соответствующую иммунизацию трансгенного млекопитающего, способного экспрессировать антитела с тяжелой цепью (т.е. с целью усиления иммунного ответа и/или антитела с тяжелой цепью, направленных против указанного антигена или мишени), получение пригодного биологического образца от указанного трансгенного млекопитающего, который содержит (кодирующие нуклеотидные последовательности) указанные последовательности  $V_HH$  (такие как образец крови, образец сыворотки или образец В-клеток), с последующей генерацией последовательностей  $V_HH$ , направленных против указанного антигена или мишени, начиная с указанного образца, с применением любого пригодного способа, по существу известного в данной области техники (такого как любой из описанных в данном документе способов или методика гибридомы). Например, для этой цели можно использовать

мышей, экспрессирующих антитела с тяжелой цепью, и другие способы и методики, которые описаны в WO 02/085945, WO 04/049794 и WO 06/008548 и Janssens et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. США. 2006 Oct. 10; 103(41):15130-5. Например, мыши, экспрессирующие антитела с тяжелой цепью, могут экспрессировать антитела с тяжелой цепью с любым пригодным (одиночным) варибельным доменом, таким как (одиночные) варибельные домены из природных источников (например, (одиночные) варибельные домены человека, (одиночные) варибельные домены представителей семейства верблюдовых или (одиночные) варибельные домены акулы, а также, например, синтетические или полусинтетические (одиночные) варибельные домены.

#### 5. Антитела, полученные из библиотек.

Антитела по данному изобретению можно выделить путем скрининга комбинаторных библиотек на предмет антител, обладающих желательной активностью или желательными активностями. Например, в данной области техники известны различные способы для создания библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек на антитела, обладающих желательными характеристиками связывания. Такие способы охарактеризованы, например, в публикации Hoogenboom et al. в *Methods in Molecular Biology*, 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) и дополнительно описаны, например, в публикации McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554; Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Marks and Bradbury, в *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 101(34):12467-12472 (2004) и Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132(2004). Способы конструирования библиотек однодоменных антител описаны, например, в патенте США № 7371849. В некоторых способах фаговых дисплеев репертуары генов V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> отдельно клонируют посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рекомбинируют случайным образом в фаговых библиотеках, которые затем можно подвергнуть скринингу на антигенсвязывающие фаги, как описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Как правило, фаг отображает фрагменты антител либо в виде одноцепочечных фрагментов Fv (scFv), либо в виде фрагментов Fab. Библиотеки, полученные из иммунизированных источников, содержат антитела, обладающие высокой аффинностью к иммуногену, следовательно, необходимость конструирования гибридом отпадает. В альтернативном варианте, можно клонировать наивный репертуар (например, человека) для получения единого источника антител к широкому спектру чужеродных антигенов, а также аутоантигенов без иммунизации, как описано в публикации Griffiths et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993). Наконец, наивные библиотеки можно также получить путем синтеза, клонируя сегменты V-генов стволовых клеток, не подвергавшиеся реаранжировке, и применяя ПЦР-праймеры, содержащие случайные последовательности, для кодирования гиперварибельной области CDR3 и осуществления реаранжировки *in vitro*, как описано в публикации Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992). Патентные публикации, в которых описаны фаговые библиотеки антител человека включают в себя, например, патент США № 5750373 и патентные публикации США № 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

Антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек антител человека, в данном документе считаются антителами человека или фрагментами антител человека.

#### 6. Мультиспецифические антитела.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложенное в данном документе антитело представляет собой мультиспецифическое антитело, например биспецифическое антитело. Мультиспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые содержат по меньшей мере два разных участка специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения одна из специфичностей связывания представляет собой антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD20, BCMA и CD38, а другая представляет собой любой другой антиген. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами антигена, выбранного из группы, состоящей из CD19, CD20, BCMA и CD38. Биспецифические антитела также можно применять для локализации цитотоксических агентов в области клеток, экспрессирующих антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD20, BCMA и CD38.

Биспецифические антитела можно получить в виде полноразмерных антител или в виде фрагментов антител. Способы получения мультиспецифических антител включают в себя, но не ограничиваются ими, рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелая цепь - легкая цепь иммуноглобулина с различной специфичностью (см. Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537 (1983)), WO 93/08829 и Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655, 1991), и инженерии согласно принципу "выступ-во-впадину" (см., например, патент № 5731168). Мультиспецифические антитела также можно получить путем конструирования электростатических направляющих эффектов для создания Fc-гетеродимерных молекул антител (WO 2009/089004 A1); перекрестного сшивания двух или большего количества антител или фрагментов (см., например, патент США № 4676980 и Brennan et al., *Science*, 229:81, 1985); использования лейциновых "молний" для получения биспецифических антител (см., например, Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5), 1547-1553 (1992)); применения технологии "диател" для изготовления биспецифических фрагментов ан-

тител (см., например, Hollinger et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); применения одноцепочечных Fv- (sFv-) димеров (см., например, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)); получения триспецифических антител, как описано, например, в публикации Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991) и создания полипептидов, содержащих tandemные однодоменные антитела (см., например, заявку на патент № 20110028695; and Conrath et al. J. Biol. Chem., 2001; 276(10):7346-50). В настоящий документ также включено конструирование антител с тремя или большим количеством функциональных антигенсвязывающих участков, включая "антитела-осьминоги" (см., например, US 2006/0025576 A1).

#### 7. Варианты антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рассматриваются варианты аминокислотных последовательностей антител, предложенных в данном документе. Например, может быть желательным улучшение аффинности и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотных последовательностей антител можно получить путем введения соответствующих модификаций в последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации содержат, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для получения конечного конструкта можно внести любую комбинацию делеций, вставок и замен при условии, что конечный конструкт обладает желательными характеристиками, например, связыванием с антигеном.

##### а) Варианты замен, вставок и делеций.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются варианты антител, содержащие одну или большее количество аминокислотных замен. Участки, представляющие интерес с точки зрения заместительного мутагенеза, включают в себя HVR и FR. Консервативные замены приведены в табл. 3 под заголовком "предпочтительные замены". Более существенные изменения приведены в табл. 3 под заголовком "Типовые замены" и подробно описаны ниже по отношению к классам боковой цепи аминокислот. В представляющее интерес антитело можно ввести аминокислотные замены и исследовать продукты посредством скрининга на предмет желательной активности, например, сохранение/улучшение способности связывать антиген, снижение иммуногенности или улучшения ADCC или CDC.

Таблица 3

#### Аминокислотные замены

Исходный остаток	Типовые замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Аминокислоты можно сгруппировать по общим свойствам боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные: Asp, Glu;

- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены приводят к замене представителя одного из этих классов на представителя другого класса.

Один тип вариантов, полученных путем замены, включает замену одного или большего количества остатков гипервариабельной области родительского антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, полученный(е) вариант(ы), отобранный для дальнейшего исследования, характеризуется модификациями (например, улучшением) определенных биологических свойств (например, повышенной аффинностью, сниженной иммуногенностью) по сравнению с родительским антителом и/или в значительной степени сохраняет определенные биологические свойства родительского антитела. Типовой вариант, получаемый путем замены, представляет собой антитело с созревшей аффинностью, которое легко получить, например, с помощью методик созревания аффинности на основе фагового дисплея, например, описанных в данном документе. Вкратце, один или большее количество остатков HVR мутируют и варианты антитела подвергают фаговому дисплею и скринингу на предмет конкретной биологической активности (например, аффинности связывания).

Модификации (например, замены) можно внести в HVR, например, для улучшения аффинности антитела. Такие модификации можно внести в "горячие точки" HVR, т.е. остатки, кодируемые кодонами, которые в процессе соматического созревания подвергаются мутациям с высокой частотой (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), и/или SDR ( $\alpha$ -CDR) с тестированием аффинности связывания полученного варианта  $V_H$  или  $V_L$ . Аффинность созревания путем конструирования и повторного выбора из вторичных библиотек описана, например, в Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology*, 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ (2001)). В некоторых вариантах осуществления созревания аффинности вносят разнообразие в вариабельные гены, выбранные для созревания с помощью одного из ряда способов (например, ПЦР пониженной точности, перетасовки цепей или олигонуклеотид-направленного мутагенеза). Затем создают вторичную библиотеку. После этого библиотеку подвергают скринингу для выявления вариантов антитела с желательной аффинностью. Еще один способ внесения разнообразия включает HVR-направленные подходы, в которых рандомизируют несколько остатков HVR (например, 4-6 остатков одновременно). Остатки HVR, участвующие в связывании антигена, можно специфически определить, например, с помощью мутагенеза с аланиновым сканированием или моделированием. При этом мишенями часто являются CDR-H3 и CDR-L3.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения замены, вставки или делеции могут возникать в одной или большем количестве HVR при условии, что такие модификации по существу не снижают способность антитела к связыванию антигена. Например, в HVR можно ввести консервативные модификации (например, консервативные замены, как предложено в данном документе), которые по существу не снижают аффинность. Такие модификации могут располагаться за пределами "горячих точек" HVR или SDR. В некоторых вариантах осуществления вариантных последовательностей  $V_H$ , приведенных выше, каждая HVR является либо не измененной, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Пригодный способ выявления остатков или областей антитела, которые могут являться мишенями для мутагенеза, называется "мутагенезом с аланиновым сканированием", как описано Cunningham and Wells (1989), *Science*, 244:1081-1085. В данном способе выявляют остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженных остатков, таких как Arg, Asp, His, Lys и Glu) и замещают их нейтральными или отрицательно заряженными аминокислотами (например, аланином или полиаланином) с целью определить, влияет ли это на взаимодействие антитела с антигеном. В аминокислотные положения, характеризующиеся функциональной чувствительностью к исходным заменам, можно вводить дополнительные замены. В альтернативном или дополнительном варианте для выявления точек контакта между антителом и антигеном используют кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело. Такие контактные или соседние с ними остатки можно применять в качестве мишеней для замены или они могут не рассматриваться как кандидаты для замены. Варианты можно подвергнуть скринингу, чтобы определить, обладают ли они желательными свойствами.

Вставки в аминокислотную последовательность включают в себя N- и/или C-концевые слияния длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих 100 или большее количество остатков, а также вставки одного или множества аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры концевых вставок включают в себя антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие вставочные варианты молекулы антитела включают в себя слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, для ADEPT) или полипептидом, что увеличивает период полужизни антитела в сыворотке.

#### b) Варианты гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложенное в данном документе антитело модифицируют с целью увеличения или уменьшения степени гликозилирования антитела. Добавление или удаление участков гликозилирования в антитело может быть с легкостью осуществлено путем изменения аминокислотной последовательности, в результате чего создается или удаляется один или

большее количество участков гликозилирования.

Если антитело содержит Fc-область, можно изменить присоединенный к ней углевод. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, как правило, содержат разветвленный двухантенарный олигосахарид, обычно присоединенный с помощью N-связи к Asn297 в CH2-домене Fc-области. (См., например, Wright et al. *TIBTECH*, 15:26-32 (1997)). Указанный олигосахарид может содержать различные углеводы, например маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в "стебле" двухантенарной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения можно выполнить модификации олигосахарида в антителе согласно данному изобретению с целью создания вариантов антител с определенными улучшенными свойствами.

В одном варианте осуществления данного изобретения предлагаются варианты антител, содержащие углеводную структуру с недостаточным количеством фукозы, присоединенной (непосредственно или косвенно) к Fc-области. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1 до 80%, от 1 до 65%, от 5 до 65% или от 20 до 40%. Количество фукозы определяют путем расчета среднего количества фукозы в углеводной цепи при Asn297 по отношению к сумме всех углеводных структур, присоединенных к Asn 297 (например, сложных гибридных структур с высоким содержанием маннозы), измеренного с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному приблизительно в положении 297 в Fc-области (EU-нумерация остатков Fc-области); однако Asn297 также может располагаться на расстоянии приблизительно  $\pm 3$  аминокислоты выше или ниже положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, из-за незначительной изменчивости последовательности антител. Такие варианты фукозилирования могут обладать улучшенной ADCC-функцией. См., например, патентные публикации США № US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, касающихся "дефукозилированных" или "фукозодефицитных" вариантов антитела, включают в себя US 2003/0157108; WO 00/61739; WO 01/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004). Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают в себя клетки Lec13 CHO, дефектные по фукозилированию белка (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); заявка на патент США № 533-545, 1986; US 2003/0157108 и WO 2004/056312 Al, Adams et al., особенно Пример 11), и клеточные линии с нокаутом, такие как клетки CHO с нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы FUT8 (см., например, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006) и WO 2003/085107).

Кроме того, предлагаются варианты антител с олигосахаридами, разделенными пополам, например, в которых двухантенарный олигосахарид, присоединенный к Fc-области антитела, разделен по GlcNAc. Такие варианты антител могут характеризоваться сниженным фукозилированием и/или улучшенной ADCC-функцией. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патент США № 6602684 (Umana et al.) и US 2005/0123546 (Umana et al.). Кроме того, предлагаются варианты антител, содержащие по меньшей мере один остаток галактозы в составе олигосахарида, присоединенного к Fc-области. Такие варианты антител могут обладать улучшенной CDC-функцией. Такие варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.).

#### с) Варианты Fc-области.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в Fc-область антитела, предложенного в данном документе, можно ввести одну или большее количество аминокислотных модификаций, тем самым получая вариант Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность Fc-области человека (например, Fc-области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или большем количестве аминокислотных положений.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рассматривается вариант антитела, обладающий некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его желательным кандидатом для вариантов применения, при которых важен период полувыведения антитела *in vivo*, а некоторые эффекторные функции (например, комплемент и ADCC) не нужны или вредны. Для подтверждения снижения/ослабления CDC- и/или ADCC-активности можно выполнить анализ цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo*. Например, чтобы убедиться в отсутствии связывания антитела с FcγR (и, следовательно, в отсутствии ADCC-активности) при сохранении способности связывания с FcRn можно выполнить анализ связывания Fc-рецептора (FcR). Основные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcRI, FcRII и FcRIII. Краткая информация об экспрессии FcR на гемопоэтических клетках приведена в табл. 3 на странице 464 публикации Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Неограничивающие примеры анализа *in vitro* для оценки

ADCC-активности молекулы, представляющей интерес, описаны в патенте США № 5500362 (см., например, Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 82:1499-1502 (1985); 5821337 (см. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). В альтернативном варианте можно использовать анализы, не связанные с использованием радиоактивных веществ (см., например, анализ цитотоксичности АСТИ™ для проточной цитометрии без использования радиоактивных веществ (Cell Technology, Inc. Маунтин-Вью, Калифорния; и анализ цитотоксичности CytoTox 96® без использования радиоактивных веществ (Promega, Мэдисон, Висконсин)). В качестве эффекторных клеток в таких анализах можно применять мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и клетки - натуральные киллеры (НК). В альтернативном или дополнительном варианте ADCC-активность молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, на модели животного, такой как описано в публикации Clynes et al. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 95:652-656 (1998). Чтобы подтвердить, что антитело не способно связывать C1q и, следовательно, не обладает CDC-активностью, можно провести анализы связывания C1q. (См., например, анализ связывания C1q и C3c методом ELISA в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента можно выполнить анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003) и Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood, 103:2738-2743 (2004)). Кроме того, можно определить связывание и выведение/период полужизни FcRn *in vivo* с помощью способов, известных в данной области техники (см., например, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Антитела с пониженной эффекторной функцией включают в себя антитела с заменой одного или большего количества из остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 Fc-области (патент США № 6737056). Такие мутанты Fc включают в себя мутанты Fc с заменами в двух или большем количестве аминокислотных положений 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемые мутанты Fc "DANA" с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7332581).

Описаны некоторые варианты антител с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR. (См., например, патент № 6737056; WO 2004/056312 и Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).)

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вариант антитела содержит Fc-область с одной или большим количеством аминокислотных замен, которые улучшают ADCC (антителозависимую клеточно-обусловленную цитотоксичность), например, с заменами в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-области (EU-нумерация остатков).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вносят изменения в Fc-область, что приводит к изменению (т.е. улучшению или снижению) связывания C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в патенте США № 6194551, WO 99/51642 и Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

Антитела с повышенным периодом полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным рецептором Fc (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), описаны в US 2005/0014934A1 (Hinton et al.). Указанные антитела содержат Fc-область с одной или большим количеством замен, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Такие варианты Fc включают в себя те, которые имеют замены в одном или большем количестве остатков Fc-области: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например замену остатка 434 Fc-области (патент США №7371826). См. также Duncan & Winter, Nature, 322:738-40 (1988); патенты США № 5648260; 5624821 и WO 94/29351 в отношении других примеров вариантов Fc-области.

d) Варианты антител, сконструированные путем введения цистеина.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть желательным получение антител, сконструированных путем введения цистеина, например "thioMAb", в которых один или большее количество остатков антитела замещены остатками цистеина В конкретных вариантах осуществления данного изобретения замещенные остатки находятся в доступных участках антитела. В результате замещения указанных остатков цистеином в доступных участках антитела располагаются реакционно-способные тиольные группы, которые можно применять для конъюгирования антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты лекарственных средств или фрагменты линкер-лекарственное средство, с получением иммуноконъюгата, как описано далее в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения цистеином можно заменить один или большее количество из следующих остатков: A118 (нумерация EU) тяжелой цепи и S400 (нумерация EU) Fc-области тяжелой цепи. Антитела, сконструированные путем введения цистеина, могут быть получены, как описано, например, в патенте США № 7521541.

e) Производные антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, предлагаемое в данном документе, можно дополнительно модифицировать путем введения дополнительных небелковых фрагментов, известных в данной области техники и легкодоступных. Фрагменты, которые можно использовать для дериватизации антитела, включают в себя, но не ограничиваются перечисленным, водорастворимые

полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают в себя полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (гомополимеры или случайные сополимеры) и декстран или поли(п-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры пропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси, но не ограничиваются ими. Пропионовый альдегид полиэтиленгликоля может обладать преимуществами при производстве из-за его стабильности в воде. Полимер может иметь любой молекулярный вес и может быть разветвленным или неразветвленным. Число полимеров, присоединенных к антигену, может изменяться, и, в случае присоединения более одного полимера, они могут представлять собой одинаковые или разные молекулы. Как правило, число и/или тип полимеров, применяемых для дериватизации, можно определить с учетом факторов, включающих, но не ограничиваясь перечисленным, конкретные свойства или функции антигена, подлежащие улучшению, независимо от того, будет ли производное антигена применяться в терапии при определенных условиях, и др.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются конъюгаты антигена с небелковым фрагментом, которые можно избирательно нагревать посредством облучения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения небелковый фрагмент представляет собой углеродную нанотрубку (Kam et al., Proc. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 102:11600-11605 (2005)). Облучение может быть любой длины волны, включая, но не ограничиваясь перечисленным, длины волн, которые не приносят вреда обычным клеткам, но нагревают небелковый фрагмент до температуры, при которой клетки, находящиеся по соседству с небелковым фрагментом, погибают.

#### Способы получения

Антигена (такие как однодоменные антигена), описанные в данном документе, можно получить с помощью любых способов, известных в данной области техники, или как описано в данном документе.

Способы получения однодоменных антигенел описаны в литературе. См., например, Els Pardon et al., Nature Protocol., 2014; 9(3):674. Однодоменные антигена (такие как V<sub>H</sub>H) можно получить с помощью способов, известных в данной области техники, например путем иммунизации представителей вида верблюдовых (например, верблюда или ламы) и получения от них гибридом, или путем клонирования библиотеки однодоменных антигенел с помощью методов молекулярной биологии, известных в данной области техники, и последующего отбора с помощью ELISA с отдельными клонами неотобранных библиотек или с применением фагового дисплея.

Для рекомбинантной продукции однодоменных антигенел нуклеиновые кислоты, кодирующие однодоменные антигена, выделяют и вставляют в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификация ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующую однодоменное антигенел, можно легко выделить и секвенировать с помощью традиционных способов (например, с применением олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антигена). Много таких векторов являются доступными. Выбор вектора частично зависит от клетки-хозяина, которая будет применяться. Как правило, предпочтительные клетки-хозяева имеют либо прокариотическое, либо эукариотическое (как правило, от млекопитающих) происхождение.

##### 1. Поликлональные антигена.

Как правило, уровень поликлональных антигенел повышается у животных в результате множества подкожных (п/к) или внутрибрюшинных (в/бр) инъекций соответствующего антигена и адъюванта. Может быть полезным конъюгирование соответствующего антигена с белком, который является иммуногенным для видов, подлежащих иммунизации, например, гемоцианином фиссуреллы (KLH), сывороточным альбумином, бычьим тиреоглобулином или ингибитором трипсина соевых бобов с применением бифункционального или дериватирующего агента, например, малеимидобензолсульфосукцинимидного эфира (конъюгирование через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глутарового альдегида, янтарного ангидрида, SOCl<sub>2</sub>, или R<sup>1</sup>N=C=NR, где R и R<sup>1</sup> являются независимо низшими алкильными группами. Примеры адъювантов, которые могут применяться, включают в себя полный адъювант Фрейнда и адъювант MPL-TDM (монофосфорил липид А, синтетический дикориномиколлат трегалозы). Протокол иммунизации может быть выбран специалистом в данной области техники без излишних экспериментов.

Животных иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или производных путем комбинирования, например, 100 или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов или мышей соответственно) с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда, с последующим инъекционным внутрикожным введением раствора в несколько участков. Через месяц животным вводят бустерную дозу, содержащую от 1/5 до 1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адъюванте Фрейнда путем подкожной инъекции в несколько участков. Через 7-14 дней у животных берут кровь и анализируют сыворотку на титр антигенел. Животным вводят бустерную дозу до достижения фазы плато для титра антигенел. Конъюгаты также можно получить в культуре рекомбинантных клеток в виде белковых соединений. Кроме того, для усиления иммунного ответа пригодны агрегирующие агенты, такие как алюмокалиевые квасцы.

## 2. Моноклональные антитела.

Моноклональные антитела получают из популяции по существу однородных антител, т.е. из популяции, отдельные антитела в которой являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Таким образом, модификатор "моноклональное" указывает на то, что антитело не является смесью отдельных антител.

Например, моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридного метода, впервые описанного Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), или могут быть получены с помощью методов рекомбинантных ДНК (см. в патенте США № 4816567).

При осуществлении гибридного метода, мышь или другое подходящее животное-хозяин, например, хомяк, иммунизируют, как описано выше, для выделения лимфоцитов, продуцирующих или способных продуцировать антитела, которые будут специфически связывать белок, применяемый для иммунизации. В альтернативном варианте лимфоциты также могут быть иммунизированы *in vitro*. Затем лимфоциты соединяют с клетками миеломы с применением пригодного агента слияния, такого как полиэтиленгликоль, с целью образования гибридной клетки (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, p. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Иммунизирующий агент обычно включает в себя антигенный белок или его вариант слияния. Как правило, если желательны клетки человеческого происхождения, применяют лимфоциты периферической крови ("ЛПК"), а если желательны источники из млекопитающих, не относящихся к человеку, применяют клетки селезенки или клетки лимфатических узлов. Затем лимфоциты соединяют с линией иммортализованных клеток, с применением пригодного агента слияния, такого как полиэтиленгликоль, с целью образования гибридной клетки. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), p. 59-103.

Как правило, линии иммортализованных клеток являются трансформированными клетками млекопитающих, в частности, миеломными клетками грызунов, быка и человека. Как правило, применяют линии клеток миеломы крысы или мыши. Полученные таким образом гибридные клетки высевают и выращивают в пригодной культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или большее количество веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых родительских клеток миеломы. Например, если в родительских клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантин гуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом обычно будет включать в себя гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые являются веществами, препятствующими росту HGPRT-дефицитных клеток.

Предпочтительными иммортализованными клетками миеломы являются те, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильный высокий уровень продукции антител выбранными клетками, продуцирующими антитела, и чувствительны к среде, такой как среда HAT. Среди них предпочтительными являются линии клеток миеломы мыши, например линии клеток, полученные из опухолей мыши MOPC-21 и MPC-11, доступных в Центре распределения клеток Salk Institute, Сан-Диего, штат Калифорния, США, и клеток SP-2 (и их производных, например, X63-Ag8-653), доступных в Американской коллекции типовых культур, Манассас, штат Вирджиния, США. Также описаны человеческие миеломные и мышино-человеческие гетеромиеломные клеточные линии, применяемые для получения моноклональных антител человека (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральную среду, в которой растут гибридные клетки, анализируют на предмет продуцирования моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридными клетками, определяют с помощью иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Культуральную среду, в которой культивируются гибридные клетки, можно анализировать на наличие моноклональных антител, направленных против антигена, представляющего интерес. Предпочтительно аффинность связывания и специфичность моноклонального антитела можно определять с помощью иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Такие методы и анализы хорошо известны в данной области техники. Например, аффинность связывания можно определить с помощью анализа Скэтчарда, описанного Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

После идентификации гибридных клеток, которые продуцируют антитела желаемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны можно субклонировать, применяя процедуры предельного разведения и выращивать с помощью стандартных способов (Goding, выше). Пригодные для этой цели культуральные среды включают в себя, например, среду D-MEM или среду RPMI-1640. Кроме того, гибридные клетки можно выращивать *in vivo* в виде опухолей у млекопитающих.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, соответственно отделяют от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, белок А-сефароза, гидроксилпатитовая хроматография, гель-электрофорез, диализ

или аффинная хроматография.

Моноклональные антитела также можно получить с помощью методов рекомбинантной ДНК, как описано в патенте США № 4816567, как описано выше. ДНК, кодирующую моноклональные антитела, можно легко выделить и секвенировать с помощью традиционных способов (например, с применением олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антител мыши). Гибридомные клетки являются предпочтительным источником такой ДНК. После выделения ДНК можно поместить в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьян, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые не производят белок иммуноглобулина иным способом, для синтеза моноклональных антител в таких рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи о рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующих антитело, включают в себя Skerra et al., *Curr. Opin. in Immunol.*, 5:256-262 (1993) и Plickthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992).

В дополнительном варианте осуществления данного изобретения антитела можно выделить из фаговых библиотек антител, сгенерированных с помощью способов, описанных в публикации McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 22:581-597 (1991) описывают выделение антител мыши и человека соответственно с применением фаговых библиотек. В последующих публикациях описано получение антител человека с высокой аффинностью (диапазон нМ) путем перетасовки цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), а также комбинаторное инфицирование и рекомбинация *in vivo* в качестве стратегии построения очень больших фаговых библиотек (Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Таким образом, эти методы являются эффективными альтернативами традиционным методам гибридомы моноклональных антител для выделения моноклональных антител.

ДНК также можно модифицировать, например, путем замещения гомологичных последовательностей мыши кодирующей последовательностью константных доменов тяжелой и легкой цепей человека (см. в патенте США № 4816567; Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), или путем ковалентного присоединения к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей или часть кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида. Как правило, такие неиммуноглобулиновые полипептиды являются замещенными в константных доменах антитела или являются замещенными в переменных доменах одного антигенсвязывающего участка антитела с целью создания химерного двухвалентного антитела, содержащего один антигенсвязывающий участок, имеющий специфичность для антигена, и другой антигенсвязывающий участок, имеющий специфичность для другого антигена.

Моноклональные антитела, описанные в данном документе, могут быть одновалентными, получение которых хорошо известно в данной области техники. Например, один способ включает рекомбинантную экспрессию легкой цепи иммуноглобулина и модифицированную тяжелую цепь. Как правило, тяжелую цепь усекают в любой точке Fc-области с целью предотвращения сшивания тяжелой цепи. В альтернативных вариантах соответствующие остатки цистеина могут быть замещены другим аминокислотным остатком или удалены с целью предотвращения сшивания. Для получения одновалентных антител также пригодны способы *in vitro*. Расщепление антител для получения их фрагментов, в частности Fab-фрагментов, можно выполнить с помощью обычных методов, известных в данной области техники.

Химерные или гибридные антитела также можно получить *in vitro* с помощью известных способов, применяемых в химии синтетических белков, включая соединения, содержащие сшивающие агенты. Например, иммунотоксины могут быть сконструированы с помощью реакции дисульфидного обмена или путем образования тиоэфирной связи. Примеры пригодных реагентов для этой цели включают в себя имиотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат.

### 3. Рекомбинантная продукция в прокариотических клетках.

#### а) Конструкция вектора.

Последовательности полинуклеиновых кислот, кодирующие антитела по данному изобретению, можно получить с помощью стандартных рекомбинантных методов. Желаемые последовательности полинуклеиновых кислот можно выделить и секвенировать из клеток, продуцирующих антитела, таких как гибридомные клетки. В альтернативном варианте полинуклеотиды можно синтезировать с помощью синтезатора нуклеотидов или методов ПЦР. После получения последовательности, кодирующие полипептиды, вводят в рекомбинантный вектор, способный реплицировать и экспрессировать гетерологичные полинуклеотиды в прокариотических хозяевах. Многие векторы, которые доступны и известны в данной области техники, можно применять для целей данного изобретения. Выбор пригодного вектора будет зависеть в основном от размера нуклеиновых кислот, которые должны быть вставлены в вектор, и конкретной клетки-хозяина, которая должна быть трансформирована вектором. Каждый вектор содержит различные компоненты, в зависимости от его функции (амплификация или экспрессия гетерологичного полинуклеотида или и то, и другое) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится. Как правило, компоненты вектора включают в себя следующие элементы, но не ограничиваются ими: источник начала репликации, ген маркера отбора, промотор, участок связывания рибосом (RBS), сигнальную последовательность, вставку с гетерологичной нуклеиновой кислотой и последова-

тельность терминации транскрипции.

В большинстве случаев плазмидные векторы, содержащие репликой и контрольные последовательности, которые получены из видов, совместимых с клеткой-хозяином, применяют применительно к этим хозяевам. Вектор обычно несет участок репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечить фенотипический отбор в трансформированных клетках. Например, *E. coli* обычно трансформируют с применением рBR322, плазмиды, полученной из видов *E. coli*. рBR322 содержит гены, кодирующие устойчивость к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tet), и, таким образом, обеспечивает простой способ идентификации трансформированных клеток. рBR322, ее производные или другие микробные плазмиды или бактериофаг также могут содержать или быть модифицированными, чтобы содержать промоторы, которые могут использоваться микробным организмом для экспрессии эндогенных белков. Примеры производных рBR322, применяемых для экспрессии конкретных антител, подробно описаны Carter et al., в патенте США № 5648237.

Кроме того, векторы фага, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином, могут применяться в качестве трансформирующих векторов применительно к этим хозяевам. Например, бактериофаг, такой как GEM™-11, можно применять при создании рекомбинантного вектора, который может применяться для трансформации восприимчивых клеток-хозяев, таких как *E. coli* LE392.

Экспрессирующий вектор согласно данному изобретению может содержать две или большее количество пар "промотор-цистрон", кодирующих каждый из полипептидных компонентов. Промотор представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность, расположенную против хода транскрипции (5') к цистрону, который модулирует его экспрессию. Как правило, прокариотические промоторы обычно делятся на два класса, индуцируемые и конститутивные. Индуцируемый промотор является промотором, который обуславливает повышение уровней транскрипции цистрона под своим контролем в ответ на изменения условий культивирования, например наличия или отсутствия питательного вещества или изменение температуры.

Известно большое количество промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами. Выбранный промотор может быть функционально связан с цистронной ДНК, кодирующей легкую или тяжелую цепь, путем удаления промотора из исходной ДНК посредством расщепления рестрикционным ферментом и введением выделенной промоторной последовательности в вектор по данному изобретению. Как нативную промоторную последовательность, так и множество гетерологичных промоторов можно применять для прямой амплификации и/или экспрессии генов-мишеней. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения применяют гетерологичные промоторы, поскольку они, как правило, обеспечивают более высокий уровень транскрипции и большее количество получаемого экспрессированного гена-мишени по сравнению с промотором нативного полипептида-мишени.

Промоторы, пригодные для применения с прокариотическими хозяевами, включают в себя промотор PhoA, системы промоторов галактамазы и лактозы, систему промоторов триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac* или *tet*. Однако пригодны и другие промоторы, которые являются функциональными в бактериях (например, другие известные бактериальные или фаговые промоторы). Их последовательности нуклеиновых кислот опубликованы в литературе, что позволяет квалифицированному специалисту оперативно лигировать их с цистронами, кодирующими целевые легкие и тяжелые цепи (Siebenlist et al. (1980), *Cell*, 20:269) с помощью линкеров или адаптеров для обеспечения любых требуемых участков рестрикции.

В одном аспекте каждый цистрон в рекомбинантном векторе содержит компонент сигнальной последовательности секреции, который направляет транслокацию экспрессированных полипептидов через мембрану. В большинстве случаев сигнальная последовательность может быть компонентом вектора или может быть частью ДНК полипептида-мишени, которая вводится в вектор. Сигнальная последовательность, выбранная для целей данного изобретения, должна быть распознана и обработана (т.е. расщеплена сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не обрабатывают сигнальные последовательности, нативные для гетерологичных полипептидов, сигнальная последовательность замещается прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей из щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или лидеров термостабильного энтеротоксина II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA и MBP. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальные последовательности, применяемые в обоих цистронах системы экспрессии, представляют собой сигнальные последовательности STII или их варианты.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения продукция антител согласно данному изобретению может происходить в цитоплазме клетки-хозяина и, следовательно, не требует наличия сигнальных последовательностей секреции в каждом цистроне. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептидные компоненты, такие как полипептид, кодирующий домен V<sub>H</sub> первой антигенсвязывающей части, в некоторых случаях слитой со второй антигенсвязывающей частью, и полипептид, кодирующий домен V<sub>L</sub> первой антигенсвязывающей части, в некоторых случаях слитой со второй антигенсвязывающей частью, экспрессируют, придают им складчатую структуру и собирают, тем самым получая функциональные антитела в цитоплазме. Определенные штаммы хозяина (например,

штаммы *E. coli* trxB) обеспечивают состояние цитоплазмы, которое является благоприятным для образования дисульфидных связей, что позволяет правильно придавать складчатую структуру и собирать экспрессированные белковые субъединицы. Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

В данном изобретении предлагается система экспрессии, в которой количественное соотношение экспрессированных полипептидных компонентов может модулироваться, чтобы максимизировать количество получаемых секретируемых и правильно собранных антител по данному изобретению. Такое модулирование выполняется по меньшей мере частично путем одновременного модулирования силы трансляции для полипептидных компонентов. Один способ модулирования силы трансляции описан Simmons et al. в патенте США № 5840523. В указанном способе применяются варианты области инициации трансляции (TIR) в цистроне. Для данной TIR может быть создана серия вариантов последовательности аминокислот или нуклеиновых кислот с диапазоном значений силы трансляции, что обеспечивает простой способ коррекции этого фактора для желаемого уровня экспрессии конкретной цепи. Варианты TIR могут быть получены с помощью обычных методов мутагенеза, что приводит к изменениям кодонов, которые могут изменять аминокислотную последовательность, хотя предпочтительными являются молчащие изменения в последовательности нуклеиновых кислот. Изменения в TIR могут включать в себя, например, изменения в количестве или расстоянии между последовательностями Shine-Dalgarno наряду с изменениями в сигнальной последовательности. Одним из способов генерации мутантных сигнальных последовательностей является создание "банка кодонов" в начале кодирующей последовательности, который не изменяет аминокислотную последовательность сигнальной последовательности (т.е. изменения являются молчащими). Это может быть достигнуто путем изменения третьего нуклеотидного положения каждого кодона; кроме того, некоторые аминокислоты, такие как лейцин, серин и аргинин, имеют несколько первых и вторых положений, которые могут усложнить процесс создания банка. Этот способ мутагенеза подробно описан в публикации Yansura et al. (1992), METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158.

Предпочтительно набор векторов генерируется с диапазоном значений силы TIR для каждого цистрона в ней. Этот ограниченный набор обеспечивает сравнение уровней экспрессии каждой цепи, а также количество желаемых белковых продуктов при различных комбинациях значений силы TIR. Значения силы TIR можно проанализировать путем количественного определения уровня экспрессии репортерного гена, как описано подробно Simmons et al. в патенте США № 5840523. На основании сравнения силы трансляции желательные индивидуальные TIR выбирают для объединения в конструкциях экспрессионного вектора по данному изобретению.

#### б) Прокариотические клетки-хозяева.

Прокариотические клетки-хозяева, пригодные для экспрессии антител по данному изобретению, включают в себя архабактерии и зубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы. Примеры пригодных бактерий включают в себя *Escherichia* (например, *E. coli*), *Bacilli* (например, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, виды *Pseudomonas* (например, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* или *Paracoccus*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения применяют грамотрицательные клетки. В одном варианте осуществления данного изобретения клетки *E. coli* применяют в качестве хозяев для данного изобретения. Примеры штаммов *E. coli* включают в себя штамм W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), p. 1190-1219; ATCC Deposit No. 27,325) и их производные, включая штамм 33D3, имеющий генотип W3110 *Afhua* (AtonA) *ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-ferE) degP41 kan<sup>®</sup>* (см. в патенте США № 5639635). Также являются пригодными другие штаммы и их производные, такие как *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) и *E. coli* RV308 (ATCC 31,608). Эти примеры носят скорее иллюстративный, чем ограничивающий характер. Способы конструирования производных любой из вышеупомянутых бактерий, имеющих определенные генотипы, известны в данной области техники и описаны, например, в публикации Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). Как правило, необходимо выбирать соответствующие бактерии с учетом воспроизводимости репликаона в клетках бактерии. Например, виды *E. coli*, *Serratia* или *Salmonella* можно соответствующим образом применять в качестве клеток-хозяев, когда для доставки репликаона применяют хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410.

Как правило, клетка-хозяин должна выделять минимальные количества протеолитических ферментов, при этом в клеточную культуру могут быть желательно включены дополнительные ингибиторы протеазы.

#### с) Продукция белков.

Клетки-хозяева трансформируют с помощью вышеописанных экспрессионных векторов и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных, если необходимо, для индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности. Трансформация означает введение ДНК в прокариотическую клетку-хозяина для того, чтобы ДНК была реплицируемой либо как внехромосомный элемент, либо с помощью хромосомного интегратора. В зависимости от применяемой клетки-хозяина трансформация выполняется с помощью стандартных методов, пригодных для таких клеток. Обработку кальцием с применением хлорида кальция, как правило, про-

дят для бактериальных клеток, которые содержат существенные барьеры клеточной стенки. В другом способе трансформации применяют полиэтиленгликоль/ДМСО. Еще одним применяемым способом является электропорация.

Прокариотические клетки, применяемые для получения антител по данному изобретению, выращивают в средах, известных в данной области техники и пригодных для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры пригодных сред включают в себя бульон Луриа (LB) плюс необходимые питательные добавки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения среда также содержит селективный агент, выбранный на основе конструкции экспрессионного вектора, для избирательного обеспечения роста прокариотических клеток, содержащих экспрессионный вектор. Например, ампициллин добавляют в среду для роста клеток, экспрессирующих ген резистентности к ампициллину.

Любые необходимые добавки, помимо источников углерода, азота и неорганических фосфатов, также могут быть включены в соответствующие концентрации, введенные отдельно или в виде смеси с другой добавкой или средой, например, комплексный источник азота. В некоторых случаях культуральная среда может содержать один или большее количество восстанавливающих агентов, выбранных из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамин, тиогликолята, дитиозритрита и дитиотреитола.

Прокариотические клетки-хозяева культивируют при соответствующих температурах. Для роста *E. coli*, например, предпочтительная температура колеблется от около 20 до около 39°C, более предпочтительно от около 25 до около 37°C, еще более предпочтительно составляет около 30°C. Показатель pH среды может быть любым показателем pH в пределах от около 5 до около 9, в зависимости, главным образом, от организма-хозяина. Для *E. coli* pH предпочтительно составляет от около 6,8 до около 7,4, а более предпочтительно - около 7,0.

Если индуцируемый промотор применяется в экспрессионном векторе по данному изобретению, экспрессия белка индуцируется в условиях, пригодных для активации промотора. В одном аспекте данного изобретения PhoA-промоторы применяют для контроля транскрипции полипептидов. Соответственно, трансформированные клетки-хозяева культивируют в фосфатно-ограничивающей среде для индуцирования. Предпочтительно фосфатно-ограничивающая среда представляет собой среду C.R.A.P (см., например, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Как известно в данной области техники, согласно применяемой векторной конструкции можно применять множество других индукторов.

Экспрессированные антитела по данному изобретению секретируются в периплазму клеток-хозяев и извлекаются из нее. Извлечение белка обычно предполагает разрушение микроорганизма, как правило, с помощью таких способов, как осмотический шок, обработка ультразвуком или лизис. Сразу после разрушения клеток клеточный дебрис или целые клетки можно извлечь с помощью центрифугирования или фильтрации. Белки можно дополнительно очистить, например, с помощью аффинной хроматографии со смолой. В альтернативном варианте белки можно переносить в культуральную среду и выделять из нее. Клетки можно удалять из культуры, а супернатант культуры - фильтровать и концентрировать для дальнейшей очистки полученных белков. Экспрессированные полипептиды можно дополнительно выделить и идентифицировать с помощью общеизвестных способов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и анализ вестерн-блоттинга.

В альтернативном варианте белка продуцируют в большом количестве с помощью процесса ферментации. Для продукции рекомбинантных белков доступны различные крупномасштабные процедуры ферментации с периодической подпиткой. Крупномасштабные процессы ферментации характеризуются ёмкостью по меньшей мере 1000 л, предпочтительно от 1000 до 100000 л. Эти ферментеры оснащены лопастными мешалками для распределения кислорода и питательных веществ, особенно глюкозы (предпочтительный источник углерода/энергии). Как правило, маломасштабный процесс ферментации предусматривает ферментацию в ферментере, объем которого не превышает около 100 л, а может составлять от около 1 до около 100 л. Во время процесса ферментации индукцию экспрессии белка обычно начинают после выращивания клеток в соответствующих условиях до желаемой плотности, например OD<sub>550</sub> около 180-220, при которой клетки находятся в ранней стационарной фазе. Как известно в данной области техники и описано выше, согласно применяемой векторной конструкции можно применять множество индукторов. Клетки можно выращивать в течение более коротких периодов перед индуцированием. Как правило, клетки индуцируют в течение около 12-50 ч, хотя период времени индуцирования может быть длиннее или короче.

С целью увеличения количества и повышения качества продуцируемых антител по данному изобретению, можно модифицировать разные условия ферментации. Например, чтобы улучшить правильную сборку и складывание секретируемых полипептидов, для совместного трансформирования прокариотических клеток-хозяев можно применять дополнительные векторы, сверхэкспрессирующие белки-шапероны, такие как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и DsbG) или FkpA (пептидилпролил-цис, транс-изомераза с шапероновой активностью). Продемонстрировано, что белки-шапероны способствуют правильному складыванию и растворимости гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen et al. (1999), *J. BioChem* 274:19601-19605; Georgiou et al., в патенте США № 6083715; Georgiou et al., в патенте США № 6027888; Bothmann and Pluckthun (2000), *J. Biol. Chem.*

275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000), *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001), *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Чтобы свести к минимуму протеолиз экспрессированных гетерологичных белков (особенно тех, которые являются протеолитически чувствительными), для данного изобретения можно применять некоторые штаммы клеток-хозяев с дефицитом протеолитических ферментов. Например, штаммы клеток-хозяев можно модифицировать для осуществления генетической(их) мутации(й) в генах, кодирующих известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI и их комбинации. Некоторые протеазадефицитные штаммы *E. coli* доступны и описаны, например, в Joly et al. (1998), выше; Georgiou et al., в патенте США № 5264365; Georgiou et al., в патенте США № 5508192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

Штаммы *E. coli* с дефицитом протеолитических ферментов и трансформированные плазмидами, сверхэкспрессирующими один или большее количество шапероновых белков, можно применять в качестве клеток-хозяев в системе экспрессии, кодирующей антитела по данному изобретению.

#### d) Очистка белка.

Полученные антитела дополнительно очищают для получения препаратов, которые по существу являются гомогенными для дальнейшего анализа и применения. Можно применять стандартные способы очистки белка, известные в данной области техники. Следующие процедуры являются типовыми пригодными процедурами очистки: фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния или на катионообменной смоле, такой как DEAE, хроматофокусирование, ДСН-ПААГ-электрофорез, осаждение сульфатом аммония и гель-фильтрация с применением, например, Sephadex G-75.

В одном аспекте белок А, иммобилизованный на твердой фазе, применяют для иммуноаффинной очистки антител, содержащих Fc-область по данному изобретению. Белок А представляет собой белок клеточной стенки 41kD из *Staphylococcus aureus*, который связывается с Fc-областью антител с высокой аффинностью. Lindmark et al. (1983), *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. Твердая фаза, к которой иммобилизован белок А, предпочтительно представляет собой колонку, содержащую поверхность стекла или диоксида кремния, более предпочтительно контролируемую колонку из пористого стекла или колонку с кремниевой кислотой. В некоторых случаях колонку покрывали реагентом, таким как глицерин, с целью предотвращения неспецифической адгезии загрязняющих веществ. Затем твердую фазу промывали для удаления примесей, неспецифически связанных с твердой фазой. Наконец, антитела, представляющие интерес, извлекали из твердой фазы путем элюирования.

#### 4. Рекомбинантная продукция в прокариотических клетках.

При эукариотической экспрессии компоненты вектора, как правило, включают в себя, но не ограничиваются ими, один или большее количество из следующих элементов: сигнальную последовательность, источник начала репликации, один или большее количество маркерных генов и энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

##### a) Компонент сигнальной последовательности.

Вектор для применения в эукариотическом хозяине может также содержать вставку, которая кодирует сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический участок расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Предпочтительно выбранная гетерологичная сигнальная последовательность является той, которая распознается и обрабатывается (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для экспрессии клеток млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, сигнал gD простого герпеса.

ДНК такой области предшественника лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей антитела по данному изобретению.

##### b) Источник начала репликации.

Как правило, необходимости в источнике начала репликации для экспрессионных векторов млекопитающих нет (источник начала репликации SV40 обычно может применяться только потому, что он содержит ранний промотор).

##### c) Компонент гена отбора.

Экспрессионные и клонирующие векторы могут содержать ген отбора, также называемый селективируемым маркером. Типовые гены отбора кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (б) дополняют ауксотрофные дефициты или (с) поставляют критически важные питательные вещества, недоступные из сложных сред, например ген, кодирующий D-аланиновую рацемазу для *Bacilli*.

В одном примере схемы отбора применяют препарат для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформируются гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий лекарственную устойчивость, и, таким образом, выживают при режиме отбора. В примерах такого доминирующего отбора применяют такие препараты, как неомицин, микофенольную кислоту и гиромоцин.

Другим примером пригодных селективируемых маркеров для клеток млекопитающих являются такие маркеры, которые позволяют идентифицировать клетки, способные принимать нуклеиновую кислоту,

кодирующую антитела по данному изобретению, такие как DHFR, тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II, предпочтительно гены металлотионеина примата, аденозиндезаминаза, орнитиндекарбоксилаза и т.д.

Например, клетки, трансформированные геном отбора DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Соответствующая клетка-хозяин, в случае применения DHFR дикого типа, представляет собой линию клеток яичника китайского хомячка (CHO) с дефицитом активности DHFR (например, ATCC CRL-9096).

В альтернативном варианте клетки-хозяева (в частности, хозяева дикого типа, которые содержат эндогенную DHFR), трансформированные или ко-трансформированные полипептид-кодирующими последовательностями ДНК, белок DHFR дикого типа и другой селективный маркер, такой как аминокликозид 3'-фосфотрансфераза (APH), можно выбрать выращивая клетки в среде, содержащей селективный агент для селективируемого маркера, такого как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. в патенте США № 4965199.

d) Компонент промотора.

Как правило, экспрессионные и клонирующие векторы содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей желаемые полипептидные последовательности. Практически все эукариотические гены имеют АТ-обогащенную область, расположенную на расстоянии около 25-30 пар оснований против хода транскрипции от участка, где иницируется транскрипция. Другая последовательность, расположенная на расстоянии около 70-80 пар оснований против хода транскрипции от начала транскрипции многих генов, представляет собой область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. 3'-конец большинства эукариот представляет собой последовательность AATAAA, которая может быть сигналом для добавления поли-А-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности можно вставить в эукариотические экспрессионные векторы.

Другие промоторы, пригодные для применения с прокариотическими хозяевами, включают в себя промотор PhoA, системы промоторов галактамазы и лактозы, промотор щелочной фосфатазы, систему промоторов триптофана (trp) и гибридные промоторы, такие как промотор tac. Однако пригодны и другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для применения в бактериальных системах также будут содержать последовательность Shine-Dalgarno (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей антитела.

Транскрипцию полипептида из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируют, например, с помощью промоторов, полученных из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (например, аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно вирус обезьян 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например промотора актина или промотора иммуноглобулина, из промоторов белков теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

Ранние и поздние промоторы вируса SV40 обычно получают в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит вирусный источник начала репликации SV40. Непосредственный ранний промотор цитомегаловируса человека обычно получают в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК у хозяев млекопитающих с применением вируса папилломы крупного рогатого скота в виде вектора описана в патенте США № 4419446. Модификация этой системы описана в патенте США № 4601978. См. также публикацию Reyes et al., Nature, 297:598-601 (1982) относительно экспрессии кДНК интерферона человека в клетках мыши под контролем промотора тимидин-киназы из вируса простого герпеса. В альтернативном варианте в качестве промотора можно применять длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

e) Компонент элемента энхансера.

Транскрипцию ДНК, кодирующей антитела по данному изобретению, у высших эукариот, часто повышают путем введения энхансерной последовательности в вектор. В данное время известны многие энхансерные последовательности из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин,  $\alpha$ -фетопротейн и инсулин). Однако, как правило, можно применять энхансер от вирусной эукариотической клетки. Примеры включают в себя энхансер SV40 на "поздней" стороне точки начала репликации (100-270 п. о.), цитомегаловирусный энхансер раннего промотора, полиомавирусный энхансер на "поздней" стороне точки начала репликации и аденовирусные энхансеры. См. также публикацию Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982) относительно энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в вектор в положении 5' или 3' в кодирующую полипептид последовательность, но предпочтительно расположен на участке 5' от промотора.

f) Компонент терминации транскрипции.

Экспрессионные векторы, применяемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжи, грибы, насекомые, растения, животные, человеческие или зародышевые клетки из других многоклеточных организмов) также будут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5'- и иногда

3'-нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей полипептид. Одним из пригодных компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота. См. публикацию WO 94/11026 и описанный в ней экспрессионный вектор.

g) Отбор и трансформация клеток-хозяев.

Пригодные клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в описанных в данном документе векторах включают в себя высшие эукариотные клетки, описанные в данном документе, включая клетки-хозяева позвоночных. Выращивание клеток позвоночных в культуре (культуре тканей) стало обычной процедурой. К примерам пригодных клеточных линий млекопитающих в качестве клеток-хозяев относятся линия клеток CV1 почек обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия эмбриональных клеток почек человека (клетки 293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, которые описаны в публикации Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детеныша хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомяка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); клетки серголи мыши (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251, 1980); клетки почек обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почек африканской зеленой обезьяны (VERO-76, ATCC CRL-1 587); клетки цервикальной карциномы человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почек собак (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI-клетки (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); клетки MRC-5; клетки FS-4 и линии гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют с помощью вышеописанных экспрессионных или клонирующих векторов для продукции антител и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных, если необходимо, для индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

h) Культивирование клеток-хозяев.

Клетки-хозяева, применяемые для продукции антител по данному изобретению, можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев пригодны коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma), минимальная питательная среда (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла в модификации Дульбекко ((DMEM), Sigma). Кроме того, любую среду, описанную в публикации Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), в патентах США № 4767704; 4657866; 4927762; 4560655 или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195 или в патенте США Re30985, можно применять в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред может быть обогащена по мере необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, солями кальция, магния и фосфатами), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как препарат ГЕНТАМИЦИН™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне), а также глюкозой или эквивалентны источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые будут известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., являются теми, которые ранее применялись с клеткой-хозяином, отобранной для экспрессии, и будут очевидны для обычного квалифицированного специалиста в данной области техники.

i) Очистка белка.

При применении рекомбинантных методов, антитела можно получить внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или непосредственно секретированными в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, на первом этапе частицы дебриса, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты удаляются, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. Carter et al., *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992) описывает процедуру выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточную суспензию оттаивают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), ЭДТК и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение около 30 мин. Клеточный дебрис можно удалить с помощью центрифугирования. Когда антитело секретируется в среду, супернатанты из таких систем экспрессии, как правило, сначала концентрируют с помощью коммерчески доступного фильтра для концентрации белка, например ультрафильтрационной установки Amicon или Millipore Pellicon. С целью ингибирования протеолиза на любом из вышеперечисленных этапов можно применять ингибитор протеазы, такой как PMSF, кроме того, для предотвращения роста случайных контаминирующих агентов можно применять антибиотики.

Композицию белка, полученную из клеток, можно очистить с помощью, например, гидроксиллаптитовой хроматографии, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем предпочтительной методикой очистки является аффинная хроматография. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого Fc-домена иммуноглобулина, который присутствует в антителе. Белок А можно применять для очистки антител, которые являются производными от иммуногло-

лобулинов человека, содержащих 1, 2 или 4 тяжелые цепи (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуется для всех изотипов мыши и для человека 3 (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, чаще всего является агарозной, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как контролируемое пористое стекло или поли(стирол-дивинил)бензол, позволяют ускорить скорость потока и сократить время обработки, по сравнению с агарозной матрицей. Если антитело содержит домен  $C_{H3}$ , для очистки пригодной является смола Bakerbond АВХТМ (J.T. Baker, Филипсбург, штат Нью-Джерси). В зависимости от антитела, подлежащего извлечению, доступны также другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарине SEPHAROSE™, хроматография на анионной или катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ-электрофорез и осаждение сульфатом аммония.

После любого(ых) этапа(ов) предварительной очистки смесь, содержащую интересующее антитело и контаминирующие агенты, может быть подвергнута хроматографии с гидрофобным взаимодействием с низким рН с применением буфера для элюирования при рН между около 2,5-4,5, предпочтительно при низких концентрациях солей (например, от около 0-0,25 М соли).

Иммуноконъюгаты.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения также предлагаются иммуноконъюгаты, содержащие любое из антител (например, однодоменные антитела), описанных в данном документе, конъюгированных с одним или большим количеством цитотоксических агентов, например, химиотерапевтическими средствами или лекарственными веществами, ингибиторами роста, токсинами (например, белковыми токсинами, токсинами бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, обладающими ферментативной активностью, или их фрагментами) или радиоактивными изотопами.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в котором антитело конъюгировано с одним или большим количеством лекарственных средств, включая, но не ограничиваясь ими, майтансиноид (см. в патентах США № 5202020, 5416064 и в Европейском патенте EP 0425235 B1); ауристати́н, например фрагменты лекарственного средства монометилауристати́на DE и DF (ММАЕ и ММАF) (см. в патентах США № 5635483 и 5780588, а также 7498298); доластати́н; калихеамицин или его производное (см. в патентах США № 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 и 5877296; Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); и Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубицин (см. Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002) и патент США № 6630579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел; трихотетен; а также СС1065.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, как описано в данном документе, конъюгированное с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая, но не ограничиваясь ими, цепь А дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модексина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАР-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин или трихотетены.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, как описано в данном документе, конъюгированное с радиоактивным атомом с образованием радио-конъюгата. Для получения радио-конъюгатов доступны разнообразные радиоактивные изотопы. Примеры включают в себя  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  и радиоактивные изотопы Lu. В случае, если радио-конъюгат применяют для обнаружения, он может содержать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например  $^{99m}Tc$  или  $^{112}In$ , или спиновую метку, применяющуюся для визуализации ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известного как магнитно-резонансная томография, МРТ), такую как, опять же, йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с применением множества бифункциональных связывающих белок агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио) пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, рициновый имму-

нотоксин можно получить, как описано в Vitetta et al., Science, 238:1098 (1987). 1-Изоотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA), меченная углеродом-14, представляет собой типичный хелатирующий агент для конъюгирования радионуклеотида с антителом. См. WO 94/11026. Линкер может представлять собой "расщепляемый линкер", облегчающий высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно применять кислотнo-лабильный линкер, чувствительный к пептидазе линкер, фотолabileный линкер, диметилловый линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); патент США № 5208020).

В данном изобретении определенно предполагается применение иммуноконъюгатов или ADC, но без ограничения, например, конъюгатов, полученных с применением реагентов кросс-линкера, включая, но не ограничиваясь ими, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон) бензоат), которые являются коммерчески доступными (например, от компании Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, штат Иллинойс, США).

Способы и композиции для диагностики и обнаружения.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения любое из антител (таких как однодоменные антитела), описанных в данном документе, являются пригодными для обнаружения наличия соответствующего антигена (такого как CD19, CD20, BCMA или CD38) в биологическом образце. В данном контексте термин "обнаружение" охватывает количественное или качественное обнаружение. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологический образец представляет собой кровь, сыворотку или другие жидкие образцы биологического происхождения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологический образец включает клетку или ткань.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-CD19 (такое как любое однодоменное антитело анти-CD19, описанное в данном документе) для применения в способе диагностики или обнаружения. В дополнительном аспекте предлагается способ обнаружения наличия CD19 в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает обнаружение наличия белка CD19 в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 представляет собой CD19 человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает приведение в контакт биологического образца с антителом анти-CD19, как описано в данном документе, в условиях, обеспечивающих связывание антитела анти-CD19 с CD19, и определение образования комплекса антитела анти-CD19 с CD19. Такой способ можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD19 применяют для выбора субъектов, подходящих для лечения с помощью антитела анти-CD19, например, если CD19 является биомаркером для отбора пациентов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-CD20 (такое как любое однодоменное антитело анти-CD20, описанное в данном документе) для применения в способе диагностики или обнаружения. В дополнительном аспекте предлагается способ обнаружения наличия CD20 в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает обнаружение наличия белка CD20 в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 представляет собой CD20 человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает приведение в контакт биологического образца с антителом анти-CD20, как описано в данном документе, в условиях, обеспечивающих связывание антитела анти-CD20 с CD20, и определение образования комплекса антитела анти-CD20 с CD20. Такой способ можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD20 применяют для выбора субъектов, подходящих для лечения с помощью антитела анти-CD20, например, если CD20 является биомаркером для отбора пациентов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-BCMA (такое как любое однодоменное антитело анти-BCMA, описанное в данном документе) для применения в способе диагностики или обнаружения. В дополнительном аспекте предлагается способ обнаружения наличия BCMA в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает обнаружение наличия белка BCMA в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA представляет собой BCMA человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает приведение в контакт биологического образца с антителом анти-BCMA, как описано в данном документе, в условиях, обеспечивающих связывание антитела анти-BCMA с BCMA, и определение образования комплекса антитела анти-BCMA с BCMA. Такой способ можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-BCMA применяют для выбора субъектов, подходящих для лечения с помощью антитела анти-BCMA, например, если BCMA является биомаркером для отбора пациентов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-CD38 (такое как любое однодоменное антитело анти-CD38, описанное в данном документе) для применения в способе диагностики или обнаружения. В дополнительном аспекте предлагается способ обнаружения

наличия CD38 в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает обнаружение наличия белка CD38 в биологическом образце.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 представляет собой CD38 человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает приведение в контакт биологического образца с антителом анти-CD38, как описано в данном документе, в условиях, обеспечивающих связывание антитела анти-CD38 с CD38, и определение образования комплекса антитела анти-CD38 с CD38. Такой способ можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD38 применяют для выбора субъектов, подходящих для лечения с помощью антитела анти-CD38, например, если CD38 является биомаркером для отбора пациентов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются меченые антитела (такие как однодоменные антитела анти-CD19, анти-CD20, анти-BCMA или анти-CD38). Метки включают в себя, но не ограничиваются перечисленным, метки или фрагменты, которые можно детектировать непосредственно (такие как флуоресцентные, хромофорные, электроноплотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также фрагменты, такие как ферменты или лиганды, которые можно детектировать косвенно, например, с помощью ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Типовые метки включают в себя, но не ограничиваются перечисленным, радиоизотопы  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  и  $^{131}\text{I}$ , флуорофоры, такие как редкоземельные хелаты или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например люцифераза светлячка и бактериальная люцифераза (описана в патенте США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу, (3-галактозидазу, глюкоамилазу, лизозим, сахаридоксидазы, например глюкооксидаза, галактооксидаза и глюкоза-6-фосфат дегидрогеназа, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантинооксидаза, присоединенные к ферменту, который использует пероксид водорода для окисления предшественника красителя, такому как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки, бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы и т.п.

### III. Химерные рецепторы антигенов.

В одном аспекте данного изобретения предлагается химерный рецептор антигенов (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий одно или большее количество однодоменных антител (таких как  $V_{\text{H}}\text{H}$ ). Любое одно однодоменное антитело, описанное в разделе II, можно применять в CAR, описанных в данном документе. Типовые CAR, содержащие один или большее количество доменов  $V_{\text{H}}\text{H}$  (т.е. CAR на основе  $V_{\text{H}}\text{H}$ ), проиллюстрированы и сравниваются с обычными CAR, содержащими scFvs (т.е. CAR на основе scFv) на фиг. 1A-1D. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что домены  $V_{\text{H}}\text{H}$  в типовых CAR на фиг. 1A-1D могут быть заменены другими sdAb.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается химерный рецептор антигенов (CAR), содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с антигеном (таким как опухолевый антиген); (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как T-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий до-

мен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моновалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является поливалентным, например двухвалентным или трехвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является мультиспецифическим, например биспецифическим.

Химерные рецепторы антигенов специфических мишеней.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются CAR, содержащие внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий любое из описанных в данном документе однодоменных антител анти-CD19, анти-CD20, анти-BCMA или анти-CD38. CAR могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифические или с большим числом специфичностей), а также CAR могут быть моновалентными или поливалентными (например, двухвалентные, трехвалентные или более с высоким числом валентностей). Перечень типовых моноспецифических химерных антигенных рецепторов, типовые последовательности, конструкции и их векторы приведены в табл. 4.

В табл. 4-6, приведенных в разделе III "Химерный рецептор антигенов", используются следующие сокращения: Тип.: типовой; Век.: вектор; AA: последовательность аминокислот CAR; NA: последовательность нуклеиновых кислот CAR; СП: сигнальный пептид; Внеклеточный: внеклеточный антигенсвязывающий домен; sdAb: однодоменное антитело; ТМ: трансмембранный домен; КО1: костимулирующий сигнальный домен 1; КО2: костимулирующий сигнальный домен 2; Перв.: первичный внутриклеточный сигнальный домен. Домены перечислены слева направо в каждой строке, которая соответствует порядку доменов от N-конца до C-конца полипептида CAR. 1. CD19 CAR.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CAR, нацеленный на CD19 (также упоминаемый в данном документе как "CD19 CAR"), содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD19 sdAb; (б) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR является моновалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR является мультиспецифическим, например биспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR является поливалентным, например двухвалентным или трехвалентным.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CD19 CAR, содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD19 sdAb; (б) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом анти-CD19 sdAb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb дополнительно содержит FR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240, FR2, содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 241, FR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 242, и/или FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 243. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8α), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8α), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8α, внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8α, трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR является моновалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR является мультиспецифическим, например биспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR является поливалентным, например двухвалентным или трехвалентным.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CD19 CAR, содержащий полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 248. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CD19 CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 248. Также предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 248.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любой CD19 CAR, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, характеризующаяся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 250. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 250. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот, кодирующих CD19 CAR, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор. 2. CD20 CAR

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CAR, нацеленный на CD20 (также упоминаемый в данном документе как "CD20 CAR"), содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD20 sdAb; (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8α), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8α), распо-

женный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR является моновалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 249. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является мультиспецифическим, например биспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR является поливалентным, например двухвалентным или трехвалентным.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CD20 CAR, содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD20 sdAb; (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом анти-CD20 sdAb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb дополнительно содержит FR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 244, FR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 245, FR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246, и/или FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 247. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен,  $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR является моновалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 249. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является мультиспецифическим, например биспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR является поливалентным, например двухвалентным или трехвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CD20 CAR, содержащий полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 249. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CD20 CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 249. Также предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 249.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любой CD20 CAR, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, характеризующаяся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 251. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 251. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор, содержащий любую из нуклеиновых

кислот, кодирующих CD20 CAR, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор.

### 3. BCMA CAR.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CAR, нацеленный на BCMA (также упоминаемый в данном документе как "BCMA CAR"), содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR является моновалентным.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается BCMA CAR, содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом анти-BCMA sdAb содержит любой из следующих элементов:

(1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29;

(2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;

(3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

(4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

(5) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;

(6) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;

(7) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

(8) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

(9) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; CDR2, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37;

(10) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; или

(11) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит домен  $V_HH$ , содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 78-88. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR является моновалентным.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается BCMA CAR, содержащий полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 152-162 и 257-259. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается BCMA CAR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 152-162 и 257-259. Также предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 152-162 и 257-259. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любой из BCMA CAR, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, характеризующаяся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 175-185 и 261-263. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, характеризующаяся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 175-185 и 261-263. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот, кодирующих BCMA CAR, описанные выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор.

#### 4. CD38 CAR.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CAR, нацеленный на CD38 (также упоминаемый в данном документе как "CD38 CAR"), содержащий полипептид, который содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD38 sdAb; (b) трансмем-

бранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD38 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 CAR является моновалентным.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CD38 CAR, содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD38 sdAb; (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом анти-CD38 sdAb содержит любой из следующих элементов:

(1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64;

(2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65;

(3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

(4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67;

(5) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;

(6) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69;

(7) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

(8) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

(9) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72;

(10) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73;

(11) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62;

тельность SEQ ID NO: 74; или

(12) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD38 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD38 sdAb содержит домен  $V_HH$ , содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-100. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 CAR является моновалентным.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CD38 CAR, содержащий полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: SEQ ID NO: 163-174 и 260. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CD38 CAR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 163-174 и 260. Также предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 163-174 и 260. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любой CD38 CAR, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, характеризующаяся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 186-197 и 264. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 186-197 и 264. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот, кодирующих CD38 CAR, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор.

##### 5. CD22 CAR.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CAR, нацеленный на CD22 (также упоминаемый в данном документе как "CD22 CAR"), содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD22 sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD22 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внут-

рикеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD22 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD22 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD22 CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD22 CAR является моновалентным.

Таблица 4

Типовые моноспецифические одновалентные CAR

Тип. Название вектора или CAR	Тип AA SE Q ID	Тип NA SE Q ID	СП	Внеклеточ. sdAb	Шарнир	ТМ	Внутриклеточная сигнализация		
							KO1	KO2	Перв
BCMA CAR									
PLVX-hEF1a-269A37346	152	175	CD8 $\alpha$	269A37346	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a-269A37348	153	176	CD8 $\alpha$	269A37348	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a-269A37917	154	177	CD8 $\alpha$	269A37917	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a-269A37355	155	178	CD8 $\alpha$	269A37355	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a-269A37915	156	179	CD8 $\alpha$	269A37915	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a-269A37936	157	180	CD8 $\alpha$	269A37936	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a-269A37953	158	181	CD8 $\alpha$	269A37953	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a-269A37965	159	182	CD8 $\alpha$	269A37965	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a-269A37972	160	183	CD8 $\alpha$	269A37972	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$

PLVX-hEF1a- 269A37353	161	184	CD8 $\alpha$	269A3 7353	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a- 269A37948	162	185	CD8 $\alpha$	269A3 7948	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
GS15011 CAR	257	261	CD8 $\alpha$	269A3 7346	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	NA	CD3 $\zeta$
GS15019 CAR	258	262	CD8 $\alpha$	269A3 7353	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	NA	CD3 $\zeta$
GS15020 CAR	259	263	CD8 $\alpha$	269A3 7917	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	NA	CD3 $\zeta$
CD38 CAR									
PLVX-hEF1a- 38A37333	163	186	CD8 $\alpha$	38A37 333	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a- 38A37336	164	187	CD8 $\alpha$	38A37 336	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a- 38A37699	165	188	CD8 $\alpha$	38A37 699	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a- 38A37331	166	189	CD8 $\alpha$	38A37 331	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a- 38A37717	167	190	CD8 $\alpha$	38A37 717	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a- 38A37719	168	191	CD8 $\alpha$	38A37 719	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a- 38A37330	169	192	CD8 $\alpha$	38A37 330	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a- 38A37334	170	193	CD8 $\alpha$	38A37 334	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a- 38A37730	171	194	CD8 $\alpha$	38A37 730	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a- 38A37340	172	195	CD8 $\alpha$	38A37 340	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a- 38A37731	173	196	CD8 $\alpha$	38A37 731	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
PLVX-hEF1a- 38A37326	174	197	CD8 $\alpha$	38A37 326	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD137	CD3 $\zeta$
CD19 V <sub>H</sub> H CAR	248	250	CD8 $\alpha$	CD19 V <sub>H</sub> H	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	NA	CD3 $\zeta$
CD20 V <sub>H</sub> H CAR	249	251	CD8 $\alpha$	CD20 V <sub>H</sub> H	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	NA	CD3 $\zeta$
GS15012 CAR	260	264	CD8 $\alpha$	38A37 717	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	NA	CD3 $\zeta$

Поливалентные химерные рецепторы антигенов.

В данном изобретении также предлагаются поливалентные CAR, которые имеют два или большее количество (например, около 2, 3, 4, 5, 6 или больше) участков связывания антигена, содержащих однодоменные антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR нацелен на один антиген и содержит два или большее количество участков связывания для одного антигена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR нацелен на более чем один антиген, и при этом поливалентный CAR содержит два или большее количество участков связывания по меньшей мере для одного антигена. Участки связывания, специфичные для одного и того же антигена, могут связываться с одним и тем же эпитопом антигена или связываться с разными эпитопами

антигена. Участки связывания, специфичные для одного и того же антигена, могут содержать одинаковые или разные однодоменные антитела.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный (например, двухвалентный, трехвалентный или с большим числом валентностей) химерный рецептор антигенов, содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество (например, около 2, 3, 4, 5, 6 или больше) однодоменных антител (sdAb), специфически связывающихся с антигеном (таким как опухолевый антиген); (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множество sdAb являются верблюдовыми, химерными, человеческими или гуманизированными. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множество однодоменных антител являются слитыми друг с другом посредством пептидных связей или пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR является мультиспецифическим, например биспецифическим.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный (например, двухвалентный, трехвалентный или с большим числом валентностей) химерный рецептор антигенов, содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело, специфически связывающееся с первым эпитопом антигена (такого как опухолевый антиген), и второе однодоменное антитело, специфически связывающееся со вторым эпитопом антигена; (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп отличается от второго эпитопа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb и/или второе sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое однодоменное антитело и второе однодоменное антитело являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR дополнительно содержит шарнирный до-

мен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR является мультиспецифическим, например биспецифическим.

Описанные в данном документе поливалентные CAR могут быть особенно пригодны для нацеливания на мультимерные антигены посредством синергетического связывания различными участками связывания антигена или для усиления аффинности связывания или авидности к антигену. Любое из описанных в данном документе однодоменных антител, таких как антитела анти-CD19, анти-CD20, анти-BCMA или анти-CD38, можно применять во внеклеточном антигенсвязывающем домене поливалентных CAR, описанных в данном документе. Перечень типовых моноспецифических поливалентных химерных антигенных рецепторов, их типовых последовательностей, конструкций и векторов приведен в табл. 5.

#### 1. Поливалентный BCMA CAR.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный CAR, нацеленный на BCMA (также упоминаемый в данном документе как "поливалентный BCMA CAR"), содержащий (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество (например, 2, 3 или большее количество) анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множество антител анти-BCMA sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидных связей или пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный BCMA CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный BCMA CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный BCMA CAR является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный BCMA CAR является трехвалентным. Для построения поливалентного BCMA CAR можно применять любое из анти-BCMA sdAb.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный BCMA CAR, содержащий (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество (например, 2, 3 или большее количество) анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом анти-BCMA sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множество антител анти-BCMA sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидных связей или пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения

тения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный ВСМА CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный ВСМА CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный ВСМА CAR является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный ВСМА CAR является трехвалентным.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный ВСМА CAR, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое анти-ВСМА sdAb и второе анти-ВСМА sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первое анти-ВСМА sdAb и второе анти-ВСМА sdAb специфически связываются с различными эпитопами на ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-ВСМА sdAb расположено на N-конце второго анти-ВСМА sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-ВСМА sdAb расположено на С-конце второго анти-ВСМА sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-ВСМА sdAb и второе анти-ВСМА sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный ВСМА CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный ВСМА CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный ВСМА CAR является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный ВСМА CAR является трехвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внеклеточный антигенсвязывающий домен дополнительно содержит третье анти-ВСМА sdAb, которое специфически связывается с эпитопом, отличающимся от первого и второго анти-ВСМА sdAb. Для построения поливалентного ВСМА CAR можно применять любое из анти-ВСМА sdAb.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный ВСМА CAR, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое анти-ВСМА sdAb и второе анти-ВСМА sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первое анти-ВСМА sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; и при этом второе анти-ВСМА sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое

анти-BCMA sdAb содержит домен  $V_{H}H$ , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-BCMA sdAb содержит домен  $V_{H}H$ , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-BCMA sdAb расположено на N-конце второго анти-BCMA sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-BCMA sdAb расположено на C-конце второго анти-BCMA sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-BCMA sdAb и второе анти-BCMA sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как T-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный BCMA CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный BCMA CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный BCMA CAR является двухвалентным.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный BCMA CAR, содержащий полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 198-199 и 265-270. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный BCMA CAR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 198-199 и 265-270. Также предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 198-199 и 265-270. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любой из поливалентных BCMA CAR, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, характеризующаяся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202-203 и 271-276. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202-203 и 271-276. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот, кодирующих поливалентные BCMA CAR, описанные выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор.

## 2. Поливалентный CD38 CAR.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный CAR, нацеленный на CD38 (также упоминаемый в данном документе как "поливалентный CD38 CAR"), содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество (например, 2, 3 или большее количество) анти-CD38 sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD38 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множество антител анти-CD38 sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидных связей или пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой

как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD38 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD38 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD38 CAR является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD38 CAR является трехвалентным. Для построения поливалентного CD38 CAR можно применять любое из анти-CD38 sdAb.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный CD38 CAR, содержащий: а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество анти-CD38 sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом каждое из множества анти-CD38 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD38 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения каждое из множества анти-CD38 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множество антител анти-CD38 sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидных связей или пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD38 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD38 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD38 CAR является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD38 CAR является трехвалентным.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный CD38 CAR, содержащий (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое анти-CD38 sdAb и второе анти-CD38 sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первое анти-CD38 sdAb и второе анти-CD38 sdAb специфически связываются с различными эпитопами на CD38. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-CD38 sdAb расположено на N-конце второго анти-CD38 sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-CD38 sdAb расположено на С-конце второго анти-CD38 sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-CD38 sdAb и второе анти-CD38 sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобре-

тения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD38 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD38 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца: сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD38 CAR является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD38 CAR является трехвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внеклеточный антигенсвязывающий домен дополнительно содержит третье анти-CD38 sdAb, которое специфически связывается с эпитопом, отличающимся от первого и второго анти-CD38 sdAb. Для построения поливалентного CD38 CAR можно применять любое из анти-CD38 sdAb.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный CD38 CAR, содержащий полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 200 или SEQ ID NO: 201.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный CD38 CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 200 или SEQ ID NO: 201. Также предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 200 или SEQ ID NO: 201. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любой из поливалентных CD38 CAR, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, характеризующаяся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 205. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 205. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот, кодирующих поливалентные CD38 CAR, описанные выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор.

### 3. Другие типовые поливалентные CAR.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный CAR, нацеленный на CD19 (также упоминаемый в данном документе как "поливалентный CD19 CAR"), содержащий (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество (например, 2, 3 или большее количество) анти-CD19 sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множество антител анти-CD19 sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидных связей или пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах

осуществления данного изобретения поливалентный CD19 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD19 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD19 CAR является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD19 CAR является трехвалентным. Для построения поливалентного CD19 CAR можно применять любое из анти-CD19 sdAb.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный CAR, нацеленный на CD20 (также упоминаемый в данном документе как "поливалентный CD20 CAR"), содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество (например, 2, 3 или большее количество) анти-CD20 sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множество антител анти-CD20 sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидных связей или пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD20 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD20 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD20 CAR является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD20 CAR является трехвалентным. Для построения поливалентного CD20 CAR можно применять любое из анти-CD20 sdAb.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается поливалентный CAR, нацеленный на CD22 (также упоминаемый в данном документе как "поливалентный CD22 CAR"), содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество (например, 2, 3 или большее количество) анти-CD22 sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD22 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множество антител анти-CD22 sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидных связей или пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD22 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления дан-

ного изобретения поливалентный CD22 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD22 CAR является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CD22 CAR является трехвалентным.

Таблица 5

CAR	Тип AA SEQ ID	Тип NA SEQ ID	СП	Внеклеточный антигенсвязывающий домен					Шарнир	ТМ	Внутриклеточная сигнализация	
				sdAb #1	Lnk. #1 SEQ ID	sdAb #2	Lnk. #2 SEQ ID	sdAb #3			КО 1	Перв.
GSI 5014	198	202	CD 8 $\alpha$	269A 3734 6	144	269A 3734 6	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD 8 $\alpha$	CD 137	CD3 $\zeta$
GSI 5015	199	203	CD 8 $\alpha$	269A 3734 6	144	269A 3734 6	144	269A 3734 6	CD8 $\alpha$	CD 8 $\alpha$	CD 137	CD3 $\zeta$
GSI 5016	200	204	CD 8 $\alpha$	38A3 7717	144	38A3 7717	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD 8 $\alpha$	CD 137	CD3 $\zeta$
GSI 5017	201	205	CD 8 $\alpha$	38A3 7717	144	38A3 7717	144	38A3 7717	CD8 $\alpha$	CD 8 $\alpha$	CD 137	CD3 $\zeta$
GSI 5021	265	271	CD 8 $\alpha$	269A 3735 3	144	269A 3791 7	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD 8 $\alpha$	CD 137	CD3 $\zeta$
GSI 5022	266	272	CD 8 $\alpha$	269A 3735 3	149	269A 3791 7	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD 8 $\alpha$	CD 137	CD3 $\zeta$
GSI 5023	267	273	CD 8 $\alpha$	269A 3735 3	151	269A 3791 7	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD 8 $\alpha$	CD 137	CD3 $\zeta$
GSI 5024	268	274	CD 8 $\alpha$	269A 3791 7	145	269A 3735 3	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD 8 $\alpha$	CD 137	CD3 $\zeta$
GSI 5025	269	275	CD 8 $\alpha$	269A 3791 7	149	269A 3735 3	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD 8 $\alpha$	CD 137	CD3 $\zeta$
GSI 5026	270	276	CD 8 $\alpha$	269A 3791 7	150	269A 3735 3	NA	NA	CD8 $\alpha$	CD 8 $\alpha$	CD 137	CD3 $\zeta$

Мультиспецифический химерный рецептор антигенов.

В данном изобретении также предлагаются мультиспецифические химерные рецепторы антигенов, нацеленные на два или большее количество (например, на около 2, 3, 4, 5, 6 или большее количество) различных антигенов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифический CAR имеет один антигенсвязывающий участок для каждого антигена. В некоторых вариантах осу-

ствления данного изобретения мультиспецифический CAR имеет более двух участков связывания по меньшей мере для одного антигена. Каждый антигенсвязывающий участок может содержать однодоменное антитело. Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифический химерный рецептор антигенов представляет собой биспецифический CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий два разных sdAb, каждое из которых специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR представляет собой триспецифический CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий три разных sdAb, каждое из которых специфически связывается с антигеном.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультиспецифический (например, биспецифический) химерный рецептор антигенов (CAR), содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с первым антигеном (таким как первый опухолевый антиген), и второе однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся со вторым антигеном (таким как второй опухолевый антиген); (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый антиген отличается от второго антигена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый антиген и/или второй антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb и/или второе sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое однодоменное антитело и второе однодоменное антитело являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифический CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифический CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца: сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ .

В зависимости от желаемого антигена, являющегося мишенью, CAR по данному изобретению могут быть сконструированы так, чтобы включать в себя соответствующие однодоменные антитела, которые являются специфическими для желаемых антигенов. Любое одно или большее количество из описанных в данном документе антител анти-CD19, анти-CD20, анти-BCMA или анти-CD38 можно применять во внеклеточном антигенсвязывающем домене в CAR согласно данному изобретению. Однодоменные антитела можно располагать в любом подходящем порядке. Например, первое однодоменное антитело соединяют с N-концом или С-концом второго однодоменного антитела. Пригодный пептидный линкер можно расположить между разными однодоменными антителами, чтобы избежать стерического несоответствия между однодоменными антителами. Перечень типовых биспецифических химерных антигенных рецепторов, их типовых последовательностей, конструкций и векторов приведен в табл. 6.

#### 1. BCMA $\times$ CD38 CAR.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR по данному изобретению представляет собой биспецифический CAR, одновременно нацеленный на BCMA и CD38. Например, BCMA и CD38 можно применять в качестве кандидатов для нацеливания антигенов, экспрессируемых на множестве миеломных клеток.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультиспецифический

(например, биспецифический) химерный рецептор антигенов, нацеленный на ВСМА и CD38 (также упоминаемый в данном документе как "ВСМА×CD38 CAR"), включающий в себя полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с ВСМА, и второе однодоменное антитело, специфически связывающееся с CD38; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb и/или второе sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое однодоменное антитело и второе однодоменное антитело являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb является слитым со вторым sdAb на N-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb является слитым со вторым sdAb на C-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ВСМА×CD38 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ВСМА×CD38 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультиспецифический (например, биспецифический) химерный рецептор антигенов, нацеленный на ВСМА и CD38 (также упоминаемый в данном документе как "ВСМА×CD38 CAR"), включающий в себя полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий однодоменное антитело анти-ВСМА и однодоменное антитело анти-CD38; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом однодоменное антитело анти-ВСМА содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; и при этом антитело анти-CD38 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-ВСМА sdAb и/или анти-CD38 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-ВСМА sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD38 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-ВСМА sdAb и анти-CD38 sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-ВСМА sdAb является слитым с анти-CD38 sdAb на N-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-ВСМА слито на C-конце с анти-CD38 sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный

сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA $\times$ CD38 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA $\times$ CD38 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается BCMA $\times$ CD38 CAR, содержащий полипептид, который содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , однодоменное антитело анти-CD38, пептидный линкер, однодоменное антитело анти-BCMA, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ ; при этом однодоменное антитело анти-BCMA содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; и при этом антитело анти-CD38 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA $\times$ CD38 CAR, содержит полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: SEQ ID NO: 207-211.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается BCMA $\times$ CD38 CAR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 207-211. Также предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 207-211. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается BCMA $\times$ CD38 CAR, содержащий полипептид, который содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , однодоменное антитело анти-BCMA, пептидный линкер, однодоменное антитело анти-CD38, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ ; при этом однодоменное антитело анти-BCMA содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; и при этом антитело анти-CD38 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA $\times$ CD38 CAR содержит полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: SEQ ID NO: 212-216. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается BCMA $\times$ CD38 CAR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 212-216. Также предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 212-216.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любой из BCMA $\times$ CD38 CAR, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, характеризующаяся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 218-227. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 218-227. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления дан-

ного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот, кодирующих ВСМА×CD38 CAR, описанные выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор.

## 2. CD19×CD20 CAR.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антигены дифференцировки В-клеток, такие как CD19 и CD20, являются кандидатами для применения в качестве антигенов-мишеней при В-клеточной лимфоме. Применение некоторых из этих антигенов в качестве мишеней для пассивной иммунотерапии моноклональными антителами характеризовалось ограниченной эффективностью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR по данному изобретению представляет собой биспецифический CAR, одновременно нацеленный на CD19 и CD20.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультиспецифический (например, биспецифический) химерный рецептор антигенов, нацеленный на CD19 и CD20 (также упоминаемый в данном документе как "CD19×CD20 CAR"), включающий в себя полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с CD19, и второе однодоменное антитело, специфически связывающееся с CD20; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb и/или второе sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое однодоменное антитело и второе однодоменное антитело являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb является слитым со вторым sdAb на N-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb является слитым со вторым sdAb на C-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19×CD20 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19×CD20 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультиспецифический (такой как биспецифический) химерный рецептор антигенов, нацеленный на CD19 и CD20 (также упоминаемый в данном документе как "CD19×CD20 CAR"), включающий в себя полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий однодоменное антитело анти-CD19 и однодоменное антитело анти-CD20; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом однодоменное антитело анти-CD19 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и при этом антитело анти-CD20 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb и/или анти-CD20 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последователь-

ность SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb и анти-CD20 sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 является слитым с анти-CD20 sdAb на N-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-CD19 является слитым с антителом анти-CD20 sdAb на C-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как T-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 $\times$ CD20 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 $\times$ CD20 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CD19 $\times$ CD20 CAR, содержащий полипептид, который содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , однодоменное антитело анти-CD19, пептидный линкер, однодоменное антитело анти-CD20, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ ; при этом однодоменное антитело анти-CD19 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и при этом антитело анти-CD20 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CD19 $\times$ CD20 CAR, содержащий полипептид, характеризующийся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 206. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CD19 $\times$ CD20 CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206. Также предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любой CD19 $\times$ CD20 CAR, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, характеризующаяся по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 217. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 217. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот, кодирующих CD19 $\times$ CD20 CAR, описанные выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор.

В данное время иммунотерапия, нацеленная на CD19, характеризуется высокой эффективностью в клинических исследованиях. В клинических исследованиях кратковременного лечения ALL с воздействием на CD19 CAR-T-клетки достигается полная ремиссия около в 90% случаев. Однако около в 10% пациентов развивался рецидив после нескольких месяцев лечения. Основная причина заключалась в том, что CD19 исчезал во время созревания В-клеток в плазматических клетках, а остаточные опухолевые клетки продуцировали исчезающие варианты антигена CD19. CD19 $\times$ CD20 CAR описанные в данном документе, могут одновременно нацеливаться на поверхностные опухолевые антигены CD19 и CD20,

которые могут усиливать системную противоопухолевую активность Т-клеток и уменьшать частоту феномена "ухода от мишени", который обуславливает по меньшей мере 30% рецидивов лейкоза после терапии CAR.

### 3. Другие типовые мультиспецифические CAR.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультиспецифический (например, биспецифический) химерный рецептор антигенов, нацеленный на CD19 и CD22 (также упоминаемый в данном документе как "CD19×CD22 CAR"), включающий в себя полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий однодоменное антитело анти-CD19 и однодоменное антитело анти-CD22; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb и/или анти-CD22 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое однодоменное антитело анти-CD22 и второе однодоменное антитело анти-CD22 являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является слитым с анти-CD22 sdAb на N-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является слитым с анти-CD22 sdAb на C-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19×CD22 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19×CD22 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультиспецифический (например, биспецифический) химерный рецептор антигенов, нацеленный на CD19 и BCMA (также упоминаемый в данном документе как "CD19×BCMA CAR"), включающий в себя полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий однодоменное антитело анти-CD19 и однодоменное антитело анти-BCMA; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb и/или анти-BCMA sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-BCMA и однодоменное антитело анти-BCMA являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является слитым с анти-BCMA sdAb на N-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является слитым с анти-BCMA sdAb на C-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный до-

мен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 $\times$ BCMA CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 $\times$ BCMA CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

Таблица 6

## Типичные биспецифические CAR

CAR	Тип. AA SEQ ID	Тип. NA SEQ ID	СП	Внеклеточный антигенсвязывающий домен			Шарнир	TM	KO1	Intra.
				sdAb #1	Линкер p SEQ ID	sdAb #2				
CD19 $\times$ CD20	206	217	CD8 $\alpha$	CD19 V <sub>H</sub> H	146	CD20 V <sub>H</sub> H	CD8 $\alpha$	CD28	CD28	CD3 $\zeta$
GSI5001	207	218	CD8 $\alpha$	38A3 7717	144	269A3 7346	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	CD3 $\zeta$
GSI5002	208	219	CD8 $\alpha$	38A3 7717	145	269A3 7346	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	CD3 $\zeta$
GSI5003	209	220	CD8 $\alpha$	38A3 7717	146	269A3 7346	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	CD3 $\zeta$
GSI5004	210	221	CD8 $\alpha$	38A3 7717	147	269A3 7346	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	CD3 $\zeta$
GSI5005	211	222	CD8 $\alpha$	38A3 7717	148	269A3 7346	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	CD3 $\zeta$
GSI5006	212	223	CD8 $\alpha$	269A 37346	144	38A37 717	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	CD3 $\zeta$
GSI5007	213	224	CD8 $\alpha$	269A 37346	145	38A37 717	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	CD3 $\zeta$
GSI5014	214	225	CD8 $\alpha$	269A	146	38A37	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	CD3 $\zeta$

008			$\alpha$	37346		717				
GS15	215	226	CD8	269A	147	38A37	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	CD3 $\zeta$
009			$\alpha$	37346		717				
GS15	216	227	CD8	269A	148	38A37	CD8 $\alpha$	CD8 $\alpha$	CD137	CD3 $\zeta$
010			$\alpha$	37346		717				

Внеклеточный антигенсвязывающий домен.

Внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR, описанный в данном документе, содержит одно или большее количество (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или большее количество) однодоменных антител. Однодоменные антитела могут быть слиты друг с другом непосредственно с помощью пептидных связей или с помощью пептидных линкеров.

#### 1. Однодоменные антитела.

CAR по данному изобретению содержат внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий одно или большее количество однодоменных антител. SdAbs могут быть одинакового или разного происхождения и одинакового или разного размера. Типовые sdAbs включают в себя, но не ограничиваются ими, вариабельные домены тяжелой цепи из антител только с тяжелой цепью (например, V<sub>H</sub>H or V<sub>NAR</sub>), связывающие молекулы, по своей природе лишенные легких цепей, единичные домены (такие как V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>), полученные из обычных четырехцепочечных антител, гуманизированные антитела только с тяжелой цепью, однодоменные антитела человека, продуцируемые трансгенными мышами или крысами, экспрессирующими сегменты тяжелой цепи человека, а также сконструированные домены и однодоменные каркасы, отличные от тех, которые получены из антител. Любые sdAb, известные в данной области техники или разработанные авторами изобретения, включая однодоменные антитела, описанные в разделе II данного документа, можно применять для конструирования CAR, описанных в данном документе. SdAb могут быть получены из любых видов, включая, но не ограничиваясь ими, мышью, крысу, человека, верблюда, ламу, миногу, рыбу, акулу, козу, кролика и быка. Однодоменные антитела, рассматриваемые в данном документе, также включают в себя встречающиеся в природе однодоменные молекулы антител от других видов, кроме представителей семейства верблюдовых и акул.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения sdAb получен из встречающейся в природе однодоменной антигенсвязывающей молекулы, известной как антитело с тяжелой цепью, лишенное легких цепей (также упоминаемое в данном документе как "антитело только с тяжелой цепью"). Такие однодоменные молекулы описаны в WO 94/04678 и в публикации Hamers-Casterman, C. et al. (1993), Nature, 363:446-448, например. Для ясности, вариабельный домен, полученный из молекулы тяжелой цепи, по своей природе лишенной легкой цепи, обозначается в данном документе как V<sub>H</sub>H, чтобы можно было отличить его от обычного V<sub>H</sub> четырехцепочечных иммуноглобулинов. Такая молекула V<sub>H</sub>H может быть получена из антител, выращенных в организме представителя вида верблюдовых, например верблюда, ламы, викунии, дромадера, альпаки и гуанако. Другие виды, кроме представителей семейства верблюдовых, могут продуцировать молекулы тяжелой цепи, по своей природе лишенные легкой цепи, причем такие V<sub>H</sub>H входят в объем и содержание данного изобретения.

Молекулы V<sub>H</sub>H представителей семейства верблюдовых являются примерно в 10 раз меньше, чем молекулы IgG. Они являются одиночными полипептидами и могут быть очень стабильными, сохраняя устойчивость к экстремальным значениям pH и температуры. Более того, они могут быть устойчивыми к действию протеаз, что не относится к обычным четырехцепочечным антителам. Более того, экспрессия *in vitro* V<sub>H</sub>H обеспечивает высокий уровень продуцирования правильно сложенных функциональных V<sub>H</sub>H. Кроме того, антитела, вырабатываемые в организме представителей семейства верблюдовых, могут распознавать эпитопы, отличные от тех, которые распознаются антителами, продуцируемыми *in vitro*, путем применения библиотек антител или путем иммунизации млекопитающих, не относящихся к семейству верблюдовых (см., например, WO 97/49805). Таким образом, мультиспецифические или поливалентные CAR, содержащие один или большее количество доменов V<sub>H</sub>H могут более эффективно взаимодействовать с мишенями, чем мультиспецифические или поливалентные CAR, содержащие антигенсвязывающие фрагменты, полученные из обычных четырехцепочечных антител. Поскольку известно, что V<sub>H</sub>H связываются с "необычными" эпитопами, такими как впадины или бороздки, аффинность CAR, включающих такие V<sub>H</sub>H, могут быть более пригодными для терапевтического применения, чем обычные мультиспецифические полипептиды.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения sdAb получен из вариабельной области иммуноглобулина, обнаруженного у хрящевой рыбы. Например, sdAb может быть получен из изоформа иммуноглобулина, известного как новый рецептор антигенов (NAR), обнаруженный в сыворотке акулы. Способы получения однодоменных молекул, полученных из вариабельной области NAR ("IgNAR"), описаны в WO 03/014161 и в публикации Streltsov (2005), Protein Sci. 14:2901-2909.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения sdAb является рекомбинантным, CDR-привитым, гуманизированным, верблюдовым, деиммунизированным и/или созданным *in vitro* (например, отобранным с помощью фагового дисплея). В некоторых вариантах осуществления данного изо-

брения аминокислотную последовательность каркасных областей можно изменить путем "оверблюдивания" определенных аминокислотных остатков в каркасных областях. "Оверблюдивание" относится к замене или замещению одного или большего количества аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности (встречающегося в природе) домена  $V_H$  от обычного четырехцепочечного антитела одним или большим количеством аминокислотных остатков, которые встречаются в соответствующем положении (положениях) в домене  $V_H$  антитела тяжелой цепи. Это может быть выполнено с помощью способов известных специалисту в данной области техники, например, согласно дальнейшему описанию. Такие "оверблюденные" замены предпочтительно вставляют в положения аминокислот, которые образуют и/или присутствуют на внутренней поверхности  $V_H$ - $V_L$  и/или на так называемых характерных остатках представителей верблюдовых, как определено в данном документе (см., например, WO 94/04678, Davies and Riechmann FEBS Letters, 339:285-290, 1994; Davies and Riechmann Protein Engineering, 9(6):531-537, 1996; Riechmann J. Mol. Biol. 259:957-969, 1996 и Riechmann and Muyldermans J. Immunol. Meth. 231:25-38, 1999). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное sdAb представляет собой однодоменное антитело человека, продуцируемое трансгенными мышами или крысами, экспрессирующими сегменты тяжелой цепи человека. См., например, US 20090307787 A1, в патенте США № 8754287, US 20150289489 A1, US 20100122358 A1 и WO 2004/049794. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения sdAb характеризуется созревшей аффинностью.

Встречающиеся в природе домены  $V_H$  против конкретного антигена или мишени можно получить из (наивных или иммунных) библиотек последовательностей  $V_H$  представителей семейства верблюдовых. Такие способы могут включать или не включать скрининг такой библиотеки с применением указанного антигена или мишени или по меньшей мере одной части фрагмента, антигенной детерминанты или его эпитопа с помощью одного или большего количества известных методов скрининга. Такие библиотеки и способы, например, описаны в WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 и WO 03/035694. В альтернативных вариантах можно применять улучшенные синтетические или полусинтетические библиотеки, полученные из (наивных или иммунных) библиотек  $V_H$ , таких как библиотеки  $V_H$ , полученные из (наивных или иммунных) библиотек  $V_H$ , с помощью таких методов, как случайный мутагенез и/или перетасовка CDR, как, например, описано в WO 00/43507.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменные антитела получают из обычных четырехцепочечных антител. См., например, EP 0368684, Ward et al. (Nature, 1989 Oct. 12; 341(6242):544-6), Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; WO 06/030220 и WO 06/003388.

## 2. Антигены.

Антиген(ы), являющийся мишенью CAR по данному изобретению, представляют собой молекулы клеточной поверхности. Однодоменные антитела можно выбрать для распознавания антигена, который функционирует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, ассоциированных со специфическим заболеванием. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген (например, первый антиген и/или второй антиген) является опухолевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифические CAR нацелены на два или большее количество опухолевых антигенов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения опухолевый антиген ассоциирован с В-клеточной малигнизацией.

Опухоли экспрессируют ряд белков, которые могут выступать в качестве антигена-мишени для иммунного ответа, в частности иммунных ответов, опосредованных Т-клетками. Антигенами-мишенями для CAR могут быть антигены, которые экспрессируются на одной пораженной клетке, или антигены, которые экспрессируются на разных клетках, каждая из которых способствует развитию заболевания. Антигены-мишени для CAR могут непосредственно или косвенно участвовать в патогенезе заболеваний. Опухолевые антигены представляют собой белки, которые продуцируются опухолевыми клетками и могут вызывать иммунный ответ, в частности иммунные ответы, опосредуемые Т-клетками. Выбор антигена-мишени по данному изобретению будет зависеть от конкретного типа рака, подлежащего лечению. Типовые опухолевые антигены включают в себя, например, глиома-ассоциированный антиген, карциноэмбриональный антиген (CEA),  $\beta$ -хорионический гонадотропин человека, альфафтопротеин (AFP), лектин-реактивный AFP, тиреоглобулин, RAGE-1, MN-CAIX, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2 (AS), кишечную карбоксиэстеразу, mut hsp70-2, M-CSF, простазу, простат-специфический антиген (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, простеин, PSMA, HER2/neu, сурвивин и теломеразу, опухолевый антиген-1 карциномы простаты (PCTA-1), MAGE, ELF2M, нейтрофильную эластазу, эфрин-B2, CD22, инсулиновый фактор роста (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I и мезотелин.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения опухолевый антиген содержит один или большее количество антигенных эпитопов, ассоциированных со злокачественной опухолью. Злокачественные опухоли экспрессируют ряд белков, которые могут выступать в качестве антигенов-мишеней для иммунной атаки. Эти молекулы включают в себя, но не ограничиваются ими, тканеспецифические антигены, такие как MART-1, тирозиназу и gp100 при меланоме и простатическую кислую фосфатазу (PAP) и простат-специфический антиген (PSA) при раке предстательной железы. Другие молекулы-мишени принадлежат к группе связанных с трансформацией молекул, например онкоген

HER2/Neu/ErbB-2. Еще одна группа целевых антигенов - это онкофетальные антигены, такие как карциноэмбриональный антиген (CEA). При В-клеточной лимфоме опухолеспецифический идиотипный иммуноглобулин представляет собой по существу опухолеспецифический иммуноглобулиновый антиген, который уникален для каждой опухоли. Антигены дифференцировки В-клеток, такие как CD19, CD20 и CD37, являются кандидатами для применения в качестве антигенов-мишеней при В-клеточной лимфоме.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения опухолевый антиген является опухолеспецифическим антигеном (TSA) или опухолеассоциированным антигеном (TAA). TSA является уникальным для опухолевых клеток и не встречается на других клетках в организме. TAA-ассоциированный антиген не является уникальным для опухолевой клетки, а, напротив, экспрессируется на нормальной клетке в условиях, которые не вызывают состояние иммунологической толерантности к антигену. Экспрессия антигена на опухоли может происходить в условиях, которые позволяют иммунной системе реагировать на антиген. TAA могут быть антигенами, которые экспрессируются на нормальных клетках в период развития плода, когда иммунная система является незрелой и неспособна реагировать, или они могут быть антигенами, которые обычно присутствуют в чрезвычайно низких уровнях на нормальных клетках, но которые экспрессируются в значительно более высоких уровнях на опухолевых клетках. Неограничивающие примеры антигенов TSA или TAA включают в себя следующее: дифференцировочные антигены, такие как MART-1/MelanA (MART-I), gp 100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2 и опухолеспецифические мультилокальные антигены, такие как MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; сверхэкспрессированные эмбриональные антигены, такие как CEA; сверхэкспрессированные онкогены и мутированные гены-супрессоры опухолевого роста, такие как p53, Ras, HER2/neu; уникальные опухолевые антигены, возникающие в результате хромосомных транслокаций; такие как BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; и вирусные антигены, такие как антиген EBVA вируса Эпштейна-Барр и антигены вируса папилломы человека (HPV) E6 и E7. Другие крупные белковые антигены включают в себя TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17. 1, NuMa, K-ras, бета-катенин, CDK4, Mum-1, p15, p16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, альфа-фетопротеин, бета-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3/CA 27. 29/BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733/EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS 1, SDCCAG16, TA-90/Mac-2 связывающий белок/С-ассоциированный белок циклофилин, TAAL6, TAG72, TLP и TPS.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген (такой как первый антиген и/или второй антиген) выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77.

### 3. Пептидные линкеры.

Различные однодоменные антитела в мультиспецифических или поливалентных CAR, описанных в данном документе, могут быть слиты друг с другом посредством пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменные антитела являются слитыми друг с другом непосредственно без каких-либо пептидных линкеров. Пептидные линкеры, связывающие разные однодоменные антитела, могут быть одинаковыми или разными. Различные домены CAR также могут быть слиты друг с другом посредством пептидных линкеров.

Каждый пептидный линкер в CAR может иметь одинаковую или разную длину и/или последовательность в зависимости от структурных и/или функциональных особенностей однодоменных антител и/или различных доменов. Каждый пептидный линкер может быть выбран и оптимизирован независимо. Длина, степень гибкости и/или другие свойства пептидного линкера(ов), применяемого в CAR, могут оказывать определенное влияние на свойства, включая, но не ограничиваясь ими, аффинность, специфичность или авидность относительно одного или большего количества конкретных антигенов или эпитопов. Например, можно выбрать более длинные пептидные линкеры во избежание стерического несоответствия между двумя расположенными рядом доменами. Например, в поливалентном или мультиспецифическом CAR по данному изобретению, который содержит однодоменные антитела, направленные против мультимерного антигена, длина и гибкость пептидных линкеров предпочтительно таковы, что позволяют каждому однодоменному антителу в поливалентном CAR связываться с антигенной детерминантой на каждой из субъединиц мультимера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения короткий пептидный линкер может быть расположен между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом CAR. В некотором варианте осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит гибкие остатки (такие как глицин и серин), так что расположенные рядом домены свободно перемещаются относительно друг друга. Например, глицин-сериновый дублет может быть пригодным пептидным линкером.

Пептидный линкер может иметь любую пригодную длину. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину по меньшей мере около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 или большее количество аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 100, 75, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или меньше аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет

длину от около 1 до около 10 аминокислот, от около 1 до около 20 аминокислот, от около 1 до около 30 аминокислот, от около 5 до около 15 аминокислот, от около 10 до около 25 аминокислот, от около 5 до около 30 аминокислот, от около 10 до около 30 аминокислот, от около 30 до около 50 аминокислот, от около 50 до около 100 аминокислот или от около 1 до около 100 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер может иметь встречающуюся в природе последовательность или не встречающуюся в природе последовательность. Например, в качестве линкера можно применить последовательность, полученную из шарнирной области антител только с тяжелой цепью. См., например, WO 96/34103. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер является гибким линкером. Примеры гибких линкеров включают глициновые полимеры (G)<sub>n</sub>, глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub>, (GGGS)<sub>n</sub> и (GGGG)<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число, по меньшей мере один), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность:

GGGG (SEQ ID NO: 144), (GGGG)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 145),  
 (GGGS)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 146), GGGSGGGSGGGGGSGSGGGGS (SEQ ID NO: 147),  
 GGGSGGGSGGGGGSGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 148),  
 (GGGG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 149), (GGGG)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 150) или (GGGG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 151).

Трансмембранный домен.

CAR по данному изобретению содержат трансмембранный домен, который может быть непосредственно или косвенно присоединен к внеклеточному антигенсвязывающему домену. Трансмембранный домен можно получить либо из природного, либо из синтетического источника. В данном контексте термин "трансмембранный домен" относится к любой белковой структуре, которая является термодинамически стабильной в клеточной мембране, предпочтительно в мембране эукариотической клетки. Трансмембранные домены, пригодные для применения в CAR, описанных в данном документе, можно получить из природного белка. В альтернативном варианте он может быть сегментом синтетического, не встречающегося в природе белка, например гидрофобным белковым сегментом, который является термодинамически стабильным в клеточной мембране.

Трансмембранные домены классифицируются на основе трехмерной структуры трансмембранного домена. Например, трансмембранные домены могут образовывать альфа-спираль, комплекс более чем из одной альфа-спирали, бета-баррель или любую другую стабильную структуру, способную охватывать двойной фосфолипидный слой клетки. Кроме того, трансмембранные домены могут также в альтернативном варианте классифицироваться на основе топологии трансмембранного домена, включая количество проходов, которые трансмембранный домен осуществляет через мембрану, и ориентацию белка. Например, однопроходные мембранные белки один раз пересекают клеточную мембрану, а многопроходные мембранные белки пересекают клеточную мембрану по меньшей мере дважды (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или большее количество раз). Мембранные белки могут быть определены как тип I, тип II или тип III в зависимости от топологии их концов и сегмента(ов), проходящих через мембрану, по отношению к внутренней и внешней поверхности клетки. Мембранные белки типа I имеют одну трансмембранную область и ориентированы так, что N-конец белка находится на внеклеточной стороне двойного липидного слоя клетки, а C-конец белка находится на цитоплазматической стороне. Мембранные белки типа II также имеют одну трансмембранную область, но они ориентированы так, что C-конец белка находится на внеклеточной стороне двойного липидного слоя клетки, а N-конец белка находится на цитоплазматической стороне. Мембранные белки типа III имеют множество трансмембранных сегментов и могут быть дополнительно подклассифицированы на основе количества трансмембранных сегментов и расположения N- и C-концов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен CAR, описанный в данном документе, получен из однопроходного мембранного белка типа I. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранные домены, полученные из многопроходных мембранных белков, также могут быть пригодными для применения в CAR, описанных в данном документе. Многопроходные мембранные белки могут содержать сложные (по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или большее количество) альфа-спирали или структуру бета-листа. Предпочтительно, чтобы N-конец и C-конец многопроходного мембранного белка присутствовали на противоположных сторонах двойного липидного слоя, например N-конец белка присутствует на цитоплазматической стороне двойного липидного слоя, а C-конец белка присутствует на внеклеточной стороне.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен CAR содержит трансмембранный домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранного домена альфа-, бета- или дзета-цепи рецептора T-клетки, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), CD160, CD19, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7Ra, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4),

CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D и/или NKG2C. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен получен из молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен получен из CD28. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен CD28 кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 135.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен получен из CD8 $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представляет собой трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен CD8 $\alpha$  кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 134.

Трансмембранные домены, пригодные для применения в CAR, описанных в данном документе, могут также содержать по меньшей мере часть сегмента синтетического, не встречающегося в природе белка. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен представляет собой синтетическую, не встречающуюся в природе альфа-спираль или бета-лист. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белковый сегмент составляет по меньшей мере около 20 аминокислот, например по меньшей мере 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или большее количество аминокислот. Примеры синтетических трансмембранных доменов известны в данной области техники, например, описанные в патенте США № 7052906 B1 и публикации PCT Publication № WO 2000/032776 A2, соответствующие описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Трансмембранный домен может содержать трансмембранную область и цитоплазматическую область, расположенную на С-концевой стороне трансмембранного домена. Цитоплазматическая область трансмембранного домена может содержать три или большее количество аминокислот и в некоторых вариантах осуществления помогает ориентировать трансмембранный домен в двойном липидном слое. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в трансмембранной области трансмембранного домена присутствуют один или большее количество остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в цитоплазматической области трансмембранного домена присутствуют один или большее количество остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения цитоплазматическая область трансмембранного домена содержит положительно заряженные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения цитоплазматическая область трансмембранного домена содержит аминокислоты аргинин, серин и лизин.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранная область трансмембранного домена содержит гидрофобные аминокислотные остатки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен CAR содержит искусственную гидрофобную последовательность. Например, триплет фенилаланина, триптофана и валина может присутствовать на С-конце трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранная область содержит в основном гидрофобные аминокислотные остатки, такие как аланин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан или валин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранная область является гидрофобной, осуществления данного изобретения трансмембранная область содержит поли-лейцин-аланиновую последовательность. Гидрофобность, или гидрофобные или гидрофильные характеристики белка или белкового сегмента можно оценить с помощью любого способа, известного в данной области техники, например, с помощью анализа гидрофобности Kyte и Doolittle.

Внутриклеточный сигнальный домен.

CAR по данному изобретению содержат внутриклеточный сигнальный домен. Внутриклеточный сигнальный домен отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной эффекторной клетки, экспрессирующей CAR. Термин "эффекторная функция" относится к специализированной функции клетки. Эффекторной функцией Т-клетки, например, может быть цитолитическая активность или хелперная активность, включая секрецию цитокинов. Таким образом, термин "цитоплазматическая сигнальная область" относится к части белка, которая трансдуцирует сигнал эффекторной функции и направляет клетку для выполнения специализированной функции. Несмотря на то, что обычно может применяться весь цитоплазматический сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости применять всю цепь. В той степени, в которой применяется усеченная часть цитоплазматического сигнального домена, такая усеченная часть применяется вместо интактной цепи до тех пор, пока она трансдуцирует сигнал эффекторной функции. Таким образом, термин "цитоплазматический сигнальный домен" включает любую усеченную часть домена цитоплазматической сигнализации, достаточную

для трансдукции сигнала эффекторной функции.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий по существу первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки. Термин "первичный внутриклеточный сигнальный домен" относится к цитоплазматической сигнальной последовательности, которая функционирует стимулирующим образом для индуцирования иммунных эффекторных функций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный мотив, известный как иммунорецепторный тирозинный активирующий мотив, или ITAM. В данном контексте "ITAM" представляет собой консервативный белковый мотив, который обычно присутствует в хвостовой части сигнальных молекул, экспрессируемых во многих иммунных клетках. Мотив может содержать два повтора аминокислотной последовательности YxxL/I, разделенных 6-8 аминокислотами, при этом каждый x независимо представляет собой любую аминокислоту, продуцирующую консервативный мотив YxxL/Ix(6-8)YxxL/I. ITAM в сигнальных молекулах важны для сигнальной трансдукции внутри клетки, которая опосредуется, по меньшей мере частично, фосфорилированием остатков тирозина в ITAM после активации сигнальной молекулы. ITAM могут также функционировать как участки стыковки для других белков, участвующих в сигнальных путях. Типовые ITAM-содержащие первичные цитоплазматические сигнальные последовательности включают в себя те, которые получены из CD3 $\zeta$ , FcR-гамма (FCER1G), FcR-бета (Fc Эпсилон Rib), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен является цитоплазматическим сигнальным доменом дикого типа CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен дикого типа CD3 $\zeta$  содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен дикого типа CD3 $\zeta$  кодируется нуклеиновой кислотой SEQ ID NO: 142. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен является функциональным мутантом цитоплазматического сигнального домена CD3 $\zeta$ , содержащего одну или большее количество мутаций, таких как Q65K. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен мутантного CD3 $\zeta$  содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен мутантного CD3 $\zeta$  кодируется нуклеиновой кислотой SEQ ID NO: 143.

Костимулирующий сигнальный домен.

Многие иммунные эффекторные клетки нуждаются в костимуляции, помимо стимуляции антиген-специфического сигнала, для индуцирования пролиферации, дифференцировки и выживания клеток, а также для активации эффекторных функций клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR содержит по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен. В данном контексте термин "костимулирующий сигнальный домен" относится по меньшей мере к части белка, которая опосредует трансдукцию сигнала внутри клетки, чтобы индуцировать иммунный ответ, например эффекторную функцию. Костимулирующий сигнальный домен химерного рецептора, описанный в данном документе, может быть цитоплазматическим сигнальным доменом из костимулирующего белка, который трансдуцирует сигнал и модулирует реакции, опосредованные иммунными клетками, такими как Т-клетки, НК-клетки, макрофаги, нейтрофилы или эозинофилы. "Костимулирующий сигнальный домен" может быть цитоплазматической частью костимулирующей молекулы. Термин "костимулирующая молекула" относится к родственному связывающему партнеру в иммунной клетке (такой как Т-клетка), которая специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ иммунной клеткой, такой как, но не ограничиваясь этим, пролиферация и выживание.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит один костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит два или большее количество (например, 2, 3, 4 или большее количество) костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит два или большее количество одинаковых костимулирующих сигнальных доменов, например две копии костимулирующего сигнального домена CD28. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит два или большее количество костимулирующих сигнальных доменов из различных костимулирующих белков, таких как любые два или большее количество костимулирующих белков, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобре-

тения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен (такой как цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$ ) и один или большее количество костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество костимулирующих сигнальных доменов и первичный внутриклеточный сигнальный домен (такой как цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$ ) являются слитыми друг с другом посредством необязательных пептидных линкеров. Первичный внутриклеточный сигнальный домен и один или большее количество костимулирующих сигнальных доменов могут быть расположены в любом пригодном порядке. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество костимулирующих сигнальных доменов расположены между трансмембранным доменом и первичным внутриклеточным сигнальным доменом (таким как домен цитоплазматической сигнализации CD3 $\zeta$ ). Множество костимулирующих сигнальных доменов могут оказывать аддитивные или синергические стимулирующие эффекты.

Активация костимулирующего сигнального домена в клетке-хозяине (например, в иммунной клетке) может индуцировать клетку к повышению или снижению продукции и секреции цитокинов, фагоцитарные свойства, пролиферацию, дифференцировку, выживание и/или цитотоксичность. Костимулирующий сигнальный домен любой костимулирующей молекулы может быть совместим для применения в CAR, описанных в данном документе. Тип(ы) костимулирующего сигнального домена выбирают на основе таких факторов, как тип иммунных эффекторных клеток, в которых будут экспрессироваться эффекторные молекулы (например, Т-клетки, НК-клетки, макрофаги, нейтрофилы или эозинофилы), и желаемой иммунной эффекторной функции (например, эффект ADCC). Примерами костимулирующих сигнальных доменов для применения в CAR могут быть цитоплазматическая сигнальная область костимулирующих белков, включая, без ограничения:

представителей семейства B7/CD28 (например, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2/B7-DC и PDCD6);

представителей суперсемейства TNF (например, 4-1BB/TNFSF9/CD137, 4-1BB лиганд/TNFSF9, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFF R/TNFRSF13C, CD27/TNFRSF7, CD27 лиганд/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, CD30 лиганд/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, CD40 лиганд/TNFSF5, DR3/TNFRSF25, GITR/TNFRSF18, GITR лиганд/TNFSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, лимфотоксин-альфа/TNF-бета, OX40/TNFRSF4, OX40 лиганд/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNF-альфа и TNF RII/TNFRSF1B);

представителей семейства SLAM (например, 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6 и SLAM/CD150);

любые другие стимулирующие молекулы, такие как CD2, CD7, CD53, CD82/Kai-1, CD90/Thy1, CD96, CD160, CD200, CD300a/LMIR1, HLA Class I, HLA-DR, икарос, интегрин альфа 4/CD49d, интегрин альфа 4 бета 1, интегрин альфа 4 бета 7/LPAM-1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP12, дектин-1/CLEC7A, DPIP/CD26, EphB6, TIM-1/KIM-1/HAVER, TIM-4, TSLP, TSLP R, лимфоцитарный функциональный антиген-1 (LFA-1), а также NKG2C.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество костимулирующих сигнальных доменов выбирают из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, CD3, лимфоцитарного функционального антигена-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лигандов, которые специфически связываются с CD83.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен CAR по данному изобретению содержит костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$  и костимулирующий сигнальный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен CD28 кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 138. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 228.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен CAR по данному изобретению содержит костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137 (т.е. 4-1BB). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$  и костимулирующий сигнальный домен CD137. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен CD137, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен CD137 кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 139.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен CAR по данному изобретению содержит костимулирующий сигнальный домен CD28 и костимулирующий сигнальный домен CD137. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$ , костимулирующий сигнальный домен CD28 и костимулирующий сигнальный домен CD137. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептид, содержащий от N-конца до C-конца: костимулирующий сигнальный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен CD137 и цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен CD28 кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 138. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен CD137, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен CD137 кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 139.

Кроме того, в пределах объема данного изобретения предлагаются собой варианты любого из костимуляторных сигнальных доменов, описанные в данном документе, обеспечивающие модулирование костимулирующим сигнальным доменом иммунного ответа иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен содержит до 10 аминокислотных остатков (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 8) по сравнению с аналогом дикого типа. Такие костимулирующие сигнальные домены, содержащие одно или большее количество изменений аминокислот, могут упоминаться как варианты. Мутация аминокислотных остатков костимулирующего сигнального домена может приводить к повышению трансдукции сигналов и усилению стимуляции иммунных ответов по сравнению с костимулирующими сигнальными доменами, которые не содержат мутации. Мутация аминокислотных остатков костимулирующего сигнального домена может приводить к снижению трансдукции сигналов и ослаблению стимуляции иммунных ответов по сравнению с костимулирующими сигнальными доменами, которые не содержат мутации.

#### Шарнирная область.

CAR по данному изобретению могут содержать шарнирный домен, который расположен между внеклеточным антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом. Шарнирный домен представляет собой сегмент аминокислот, который обычно находится между двумя доменами белка и может обеспечивать гибкость белка и перемещение одного или обоих доменов относительно друг друга. Можно применять любую аминокислотную последовательность, которая обеспечивает такую гибкость и перемещение внеклеточного антигенсвязывающего домена относительно трансмембранного домена эффекторной молекулы.

Шарнирный домен может содержать около 10-100 аминокислот, например любое количество из 15-75 аминокислот, 20-50 аминокислот или 30-60 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен имеет длину по меньшей мере около 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен представляет собой шарнирный домен встречающегося в природе белка. Шарнирные домены любого белка, известные в данной области техники, включают шарнирный домен, являющийся пригодным для применения в описанных в данном документе химерных рецепторах. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен представляет собой по меньшей мере часть шарнирного домена встречающегося в природе белка и обеспечивает гибкость для химерного рецептора. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен получен из CD8 $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен представляет собой часть шарнирного домена CD8 $\alpha$ , например фрагмент, содержащий по меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30, 35 или 40) последовательных аминокислот шарнирного домена CD8 $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен CD8 $\alpha$  содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен CD8 $\alpha$  кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 131.

Шарнирные домены антител, таких как антитела IgG, IgA, IgM, IgE или IgD, также являются пригодными для применения в pH-зависимых химерных рецепторных системах, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен представляет собой шарнирный домен, который соединяет константные домены C<sub>H</sub>1 и C<sub>H</sub>2 антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен является доменом антитела и содержит шарнирный домен антитела и одну или большее количество константных областей антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен содержит шарнирный домен антитела и константную область C<sub>H</sub>3 антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобрете-

ния шарнирный домен содержит шарнирный домен антитела и константные области  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$  антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело представляет собой антитело IgG, IgA, IgM, IgE или IgD. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирная область содержит шарнирную область и константные области  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$  антитела IgG1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирная область содержит шарнирную область и константную область  $C_{H3}$  антитела IgG1.

Пептиды, не встречающиеся в природе, также могут применяться в качестве шарнирных доменов для химерных рецепторов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен между С-концом внеклеточного лигандсвязывающего домена Fc-рецептора и N-концом трансмембранного домена представляет собой пептидный линкер, такой как (GxS) n-линкер, где x и n независимо могут представлять собой целое число от 3 до 12, включая 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и больше. Сигнальный пептид CAR по данному изобретению может содержать сигнальный пептид (также известный как сигнальная последовательность) на N-конце полипептида. Как правило, сигнальные пептиды представляют собой последовательности пептидов, которые нацеливают полипептид на необходимый участок в клетке. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид нацеливает эффекторную молекулу на секреторный путь клетки и обеспечивает интеграцию и закрепление эффекторной молекулы в двойном липидном слое. Сигнальные пептиды, включая сигнальные последовательности природных или синтетических белков, не встречающиеся в природе сигнальные последовательности, которые пригодны для применения в CAR, описанных в данном документе, будут знакомы специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид получен из молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , ГМКСФ-рецептора  $\alpha$  и тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид получен из CD8 $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид CD8 $\alpha$  содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид CD8 $\alpha$  кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 128 или SEQ ID NO: 129.

#### IV. Сконструированные иммунные эффекторные клетки.

Дополнительно в данном изобретении предлагаются клетки-хозяева (например, иммунные эффекторные клетки), содержащие любой из CAR, описанных в данном документе.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая мультиспецифический (например, биспецифический) химерный рецептор антигенов (CAR), который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с первым антигеном (таким как первый опухолевый антиген), и второе однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся со вторым антигеном (таким как второй опухолевый антиген); (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый антиген отличается от второго антигена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый антиген и/или второй антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb и/или второе sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое однодоменное антитело и второе однодоменное антитело являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифический CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифический CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), распо-

ложенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая ВСМА $\times$ CD38 CAR, который содержит полипептид, включающий в себя (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий однодоменное антитело анти-ВСМА и однодоменное антитело анти-CD38; (б) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-ВСМА sdAb и/или анти-CD38 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-ВСМА и однодоменное антитело анти-CD38 являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-ВСМА sdAb является слитым с анти-CD38 sdAb на N-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-ВСМА sdAb является слитым с анти-CD38 sdAb на C-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ВСМА $\times$ CD38 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ВСМА $\times$ CD38 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-ВСМА содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело анти-CD38 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ВСМА $\times$ CD38 CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 207-216. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, мононуклеарную

клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая CD19×CD20 CAR, который содержит полипептид, включающий в себя (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий однодоменное антитело анти-CD19 и однодоменное антитело анти-CD20; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb и/или анти-CD20 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD20 и однодоменное антитело анти-CD20 являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 является слитым с анти-CD20 sdAb на N-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является слитым с анти-CD20 sdAb на C-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19×CD20 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19×CD20 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD20 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19×CD20 CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, NK-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая CD19×CD22 CAR, который содержит полипептид, включающий в себя: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий однодоменное антитело анти-CD19 и однодоменное антитело анти-CD22; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb и/или анти-CD22 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое однодоменное антитело анти-CD22 и второе однодоменное антитело анти-CD22 являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является слитым с анти-CD22 sdAb на N-конце. В некоторых вариантах осуществления данного

изобретения анти-CD19 sdAb является слитым с анти-CD22 sdAb на С-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 $\times$ CD22 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 $\times$ CD22 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен CD28, костимуляторный сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая CD19 $\times$ BCMA CAR, который содержит полипептид, включающий в себя (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий однодоменное антитело анти-CD19 и однодоменное антитело анти-BCMA; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb и/или анти-BCMA sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-BCMA и однодоменное антитело анти-BCMA являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является слитым с анти-BCMA sdAb на N-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является слитым с анти-BCMA sdAb на С-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 $\times$ BCMA CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 $\times$ BCMA CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внекле-

точный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, NK-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая поливалентный химерный рецептор антигенов, который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество однодоменных антител (sdAb), специфически связывающихся с антигеном (таким как опухолевый антиген); (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множество sdAb являются верблюдовыми, химерными, человеческими или гуманизированными. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множество однодоменных антител являются слитыми друг с другом посредством пептидных связей или пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR является мультиспецифическим, например биспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 198-201.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая поливалентный химерный рецептор антигенов, который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело, специфически связывающееся с первым эпитопом антигена (такого как опухолевый антиген), и второе однодоменное антитело, специфически связывающееся со вторым эпитопом антигена; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп отличается от второго эпитопа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb и/или второе sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления

данного изобретения первое однодоменное антитело и второе однодоменное антитело являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая CD19 химерный рецептор антигенов, который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD19 sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом анти-CD19 sdAb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 248. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная им-

мунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая CD20 CAR, который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD20 sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом анти-CD20 sdAb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb дополнительно содержит FR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 244, FR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 245, FR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246, и/или FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 247. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8α), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8α), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8α, внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8α, трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 249. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая BCMA CAR, который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом анти-BCMA sdAb содержит любой из следующих элементов:

(12) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29;

(13) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;

(14) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

(15) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

(16) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;

(17) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;

(18) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;

тельность SEQ ID NO: 35;

(19) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

(20) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37;

(21) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; или

(22) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит домен  $V_{HH}$ , содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 78-88. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 152-162. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая CD38 CAR, который содержит полипептид, содержащий (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD38 sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом анти-BCMA sdAb содержит любой из следующих элементов:

(13) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64;

(14) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65;

(15) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

(16) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67;

тельность SEQ ID NO: 67;

(17) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;

(18) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69;

(19) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

(20) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

(21) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72;

(22) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73;

(23) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; или

(24) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD38 sAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD38 sAb содержит домен  $V_HH$ , содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-100. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , анти-CD38 sAb, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CD38 CAR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 163-174. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, NK-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной.

В данном изобретении также предлагаются сконструированные иммунные эффекторные клетки, содержащие (или экспрессирующие) два или большее количество различных CAR. Любые два или большее количество из CAR, описанных в данном документе, могут экспрессироваться в комбинации. CAR могут нацеливаться на различные антигены, тем самым обеспечивая синергические или аддитивные

эффекты. Поскольку однодоменные антитела во внеклеточных антигенсвязывающих доменах CAR имеют только отдельные переменные цепи антигена (например, тяжелые цепи), такие CAR-экспрессирующие клетки не имеют проблем с ошибочным спариванием переменных цепей, что продемонстрировано в сконструированных иммунных эффекторных клетках, коэкспрессирующих два или большее количество CAR на основе scFv. Типовые сконструированные иммунные эффекторные клетки, коэкспрессирующие два CAR на основе V<sub>H</sub>H, проиллюстрированы на фиг. 1Е. Специалисту в данной области техники будет понятно, что CAR на основе других sdAb или имеющие другие структуры, как описано в данном документе, могут быть коэкспрессированы в сконструированных иммунных эффекторных клетках, два или большее количество CAR могут быть закодированы на одном и том же векторе или на разных векторах.

Сконструированная иммунная эффекторная клетка может дополнительно экспрессировать один или большее количество терапевтических белков и/или иммуномодуляторов, таких как ингибиторы иммунной контрольной точки. См., например, международные заявки на патент № PCT/CN2016/073489 и PCT/CN2016/087855, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

#### Векторы.

В одном аспекте данного изобретения предлагаются векторы для клонирования и экспрессии любого одного из CAR, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор является пригодным для репликации и интеграции в эукариотических клетках, таких как клетки млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой вирусный вектор. Примеры векторов включают в себя, но не ограничиваются ими, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, лентивирусный вектор, ретровирусные векторы, вектор вируса осповакцины, герпесвирусный вектор и их производные. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в руководстве Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии.

Разработан ряд вирусных систем для переноса генов в клетки млекопитающих. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Гетерологичную нуклеиновую кислоту можно вставить в вектор и упаковать в ретровирусные частицы с помощью методов, известных в данной области техники. Рекомбинантный вирус затем можно выделить и поместить в сконструированную клетку млекопитающего *in vitro* или *ex vivo*. В данной области техники известен ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения применяют аденовирусные векторы. В данной области техники известен ряд аденовирусных векторов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения применяют лентивирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения применяют самоинактивирующие лентивирусные векторы. Например, самоинактивирующие лентивирусные векторы, несущие последовательность, кодирующую иммуномодулятор (например, ингибитор иммунной контрольной точки), и/или самоинактивирующие лентивирусные векторы, несущие химерные рецепторы антигенов, могут быть упакованы согласно протоколам, известным в данной области техники. Полученные лентивирусные векторы можно применять для трансдукции клетки млекопитающих (например, первичных Т-клеток человека) с помощью способов, известных в данной области техники. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются пригодными инструментами для достижения длительного переноса генов, поскольку они обеспечивают длительную стабильную интеграцию трансгена и его распространение в клетках потомства. Лентивирусные векторы также обладают низкой иммуногенностью и могут трансдуцировать непролиферирующие клетки.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор содержит любую из нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, описанный в данном документе. Нуклеиновую кислоту можно клонировать в вектор с помощью любых способов молекулярного клонирования, известных в данной области техники, включая, например, применение участков рестрикционной эндонуклеазы и одного или большего количества селективируемых маркеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота является функционально связанной с промотором. Разновидности промоторов проанализированы относительно экспрессии генов в клетках млекопитающих, и любой из промоторов, известных в данной области техники, можно применять в данном изобретении. Промоутеры могут быть классифицированы на конститутивные промоторы или регулируемые промоторы, такие как индуцируемые промоторы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, является функционально связанной с конститутивным промотором. Конститутивные промоторы позволяют гетерологичным генам (также называемым трансгенами) конститутивно экспрессироваться в клетках-хозяевах. Типовые конститутивные промоторы, рассматриваемые в данном документе, включают в себя, но не ограничиваются ими, промоторы цитомегаловируса (CMV), факторы элонгации-1 $\alpha$  человека (hEF1 $\alpha$ ), промотор убиквитина С (UbiC), промотор фосфолипидкиназы (PGK), ранний промотор вируса 40 обезьян (SV40) и промотор  $\beta$ -актина кур в сочетании с ранним энхансером CMV (CAGG). Эффективность таких конститутивных промоторов на стимулирование трансгенной экспрессии детально

сравнивалась во множестве исследований. Например, Michael C. Milone et al. сравнивали эффективность CMV, hEF1 $\alpha$ , UbiC и PGK с целью стимулирования экспрессии химерного антигенного рецептора в первичных Т-клетках человека и пришли к выводу, что промотор hEF1 $\alpha$  не только индуцировал самый высокий уровень экспрессии трансгена, но также оптимально поддерживался в Т-клетках CD4 и CD8 человека (Molecular Therapy, 17(8):1453-1464 (2009)). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, является функционально связанной с промотором hEF1 $\alpha$ .

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, является функционально связанной с индуцируемым промотором. Индуцируемые промоторы относятся к категории регулируемых промоторов. Индуцируемый промотор может индуцироваться одним или большим количеством состояний, таких как физическое состояние, микроокружение сконструированной иммунной эффекторной клетки или физиологическое состояние сконструированной иммунной эффекторной клетки, индуктором (т.е. индуцирующим агентом) или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индуцирующее состояние не индуцирует экспрессию эндогенных генов в сконструированной клетке млекопитающих и/или у субъекта, который получает фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индуцирующее состояние выбирают из группы, состоящей из индуктора, облучения (например, ионизирующее излучение, свет), температуры (например, тепло), окислительно-восстановительных условий, микроокружения опухоли и состояния активации сконструированной клетки млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор также содержит селективируемый маркерный ген или репортерный ген для отбора клеток, экспрессирующих CAR, из популяции клеток-хозяев, трансфицированных посредством лентивирусных векторов. Как селективируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями с целью обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Например, вектор может содержать транскрипционные и трансляционные терминаторы, последовательности инициации и промоторы, пригодные для регуляции экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор содержит более чем одну нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность первой нуклеиновой кислоты, кодирующую первый CAR, и последовательность второй нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CAR, при этом первая нуклеиновая кислота является функционально связанной со второй нуклеиновой кислотой посредством последовательности третьей нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения саморасщепляющийся пептид выбирают из группы, состоящей из T2A, P2A и F2A. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептид T2A имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 254. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептид T2A кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 255. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая BCMA CAR и CD38 CAR, и содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 239.

Иммунные эффекторные клетки.

"Иммунные эффекторные клетки" представляют собой иммунные клетки, которые могут выполнять иммунные эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммунные эффекторные клетки экспрессируют по меньшей мере Fc $\gamma$ RIII и выполняют эффекторную функцию ADCC. Примеры иммунных эффекторных клеток, которые опосредуют ADCC, включают в себя мононуклеарные клетки периферической крови (МПКК), естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы, а также эозинофилы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммунные эффекторные клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки представляют собой CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки продуцируют IL-2, TFN, и/или TNF на фоне экспрессии CAR и связывания с клетками-мишенями, такими как опухолевые клетки CD20<sup>+</sup> или CD19<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD8<sup>+</sup> Т-клетки лизируют антигенспецифические клетки-мишени на фоне экспрессии CAR и связывания с клетками-мишенями.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммунные эффекторные клетки представляют собой NK-клетки. В других вариантах осуществления данного изобретения иммунные эффекторные клетки могут быть широко известными линиями клеток, например клеток NK-92.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммунные эффекторные клетки являются дифференцированными от стволовых клеток, таких как гемопоэтическая стволовая клетка, плюрипотентная стволовая клетка, iPS или эмбриональная стволовая клетка.

Сконструированные иммунные эффекторные клетки получают путем введения CAR в иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR вводят в иммунные эффекторные клетки путем трансфекции любой из выделенных нуклеиновых

кислот или любого из векторов, описанных в разделе III. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR вводят в иммунные эффекторские клетки путем введения белков в клеточную мембрану при прохождении клеток через микрожидкостную систему, такую как CELL SQUEEZE® (см., например, в публикации патентной заявки США № 20140287509).

Способы введения векторов или выделенных нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области техники. Описанные векторы можно переносить в иммунную эффекторскую клетку посредством физических, химических или биологических способов.

Физические способы введения вектора в иммунную эффекторскую клетку включают в себя осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т.п. Способы продуцирования клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор вводят в клетку с помощью электропорации.

Биологические способы введения вектора в иммунную эффекторскую клетку включают в себя применение ДНК- и РНК-векторов. Вирусные векторы стали наиболее широко применяемой системой для вставки генов в клетки млекопитающих, например клетки человека.

Химические способы для введения вектора в иммунную эффекторскую клетку включают в себя коллоидные дисперсионные системы, такие как комплексы макромолекул, нанокapsулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы, а также липосомы. Типовая коллоидная система для применения в качестве несущей среды для доставки *in vitro* представляет собой липосому (например, искусственная мембранная везикула).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения молекулы РНК, кодирующие любой из CAR, описанных в данном документе, могут быть получены с помощью обычных способов (например, с помощью транскрипции *in vitro*), а затем введены в иммунные эффекторские клетки с помощью известных способов, таких как электропорация мРНК. См., например, Rabinovich et al., *Human Gene Therapy* 17:1027-1035.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансдуцированная или трансфицированная иммунная эффекторская клетка размножается *ex vivo* после введения вектора или выделенной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансдуцированная или трансфицированная иммунная эффекторская клетка культивируется для размножения по меньшей мере в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12 или 14 дней. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансдуцированную или трансфицированную иммунную эффекторскую клетку дополнительно оценивают или скринируют, чтобы выбрать сконструированную клетку млекопитающего.

Репортерные гены можно применять для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В большинстве случаев репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется организмом-реципиентом или тканью и который кодирует полипептид, экспрессия которого подтверждается определенным легко обнаруживаемым свойством, например ферментной активностью. Экспрессию репортерного гена анализируют в соответствующее время после введения ДНК в клетки-реципиенты. Пригодные репортерные гены могут включать в себя гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретрируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al. *FEBS Letters*, 479:79-82 (2000)). Пригодные системы экспрессии являются хорошо известными и могут быть приготовлены с помощью известных способов или получены на коммерческих условиях.

Другие способы подтверждения наличия нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR в сконструированной иммунной эффекторской клетке, включают в себя, например, молекулярно-биологические анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; биохимические анализы, такие как обнаружение наличия или отсутствия конкретного пептида, например с помощью иммунологических методов (таких как ELISA и вестерн-блот).

#### 1. Источники Т-клеток.

До размножения и генетической модификации Т-клеток источник Т-клеток получают от индивидуума. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из участка инфекции, асцитическую жидкость, плевральный выпот, ткань селезенки, а также опухоли. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения можно применять любое количество линий Т-клеток, доступных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения

Т-клетки можно получить из образца крови, собранной у субъекта, с помощью любого количества методов, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение Ficoll™. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки из циркулирующей крови индивидуума получают путем афереза. Как правило, продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты,

гранулоциты, В-клетки, другие ядерные лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки, полученные с помощью афереза, можно промыть для удаления фракции плазмы и поместить клетки в соответствующий буфер или среду для проведения последующих этапов обработки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки промывают физиологическим раствором, забуференным фосфатом (PBS). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в промывочном растворе отсутствует кальций и может отсутствовать магний или могут отсутствовать многие, если не все, двухвалентные катионы. Кроме того, неожиданно было обнаружено, что на начальных этапах активации в отсутствие кальция наблюдается усиленная активация. Специалистам в данной области техники будет четко понятно, что этап промывки можно выполнить с помощью способов, известных специалистам в данной области техники, таких как применение полуавтоматической "проточной" центрифуги (например, устройство для обработки клеток Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5) согласно инструкциям производителя. После промывания клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах, таких как, например, PBS, не содержащий  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -PlasmaLyte A или другой солевой раствор с буфером или без него. В альтернативном варианте нежелательные компоненты образца афереза можно удалить, а клетки непосредственно ресуспендировать в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови путем лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например, с помощью центрифугирования посредством градиента PERCOLL™ или противоточного элютриационного центрифугирования. Кроме того, специфическую субпопуляцию Т-клеток, такую как  $\text{CD3}^+$ ,  $\text{CD28}^+$ ,  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$ ,  $\text{CD45RA}^+$  и  $\text{CD45RO}^+$  Т-клетки, можно выделить с помощью сортировки путем положительного или отрицательного отбора. Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки выделяют путем инкубации с анти-CD3/анти-CD28 (т.е. 3×28)-конъюгированных гранул, таких как DY-NABEADS® M-450 CD3/CD28 T, в течение периода времени, достаточного для положительного отбора необходимых Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения период времени составляет около 30 мин. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения период времени составляет от 30 мин до 36 ч или дольше и включает все целые значения между ними. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 ч. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения период времени составляет от 10 до 24 ч. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения период инкубации составляет 24 ч. При выделении Т-клеток у пациентов с лейкозом применение более длительных периодов инкубации, например 24 ч, может увеличить количество получаемых клеток. Более длительное время инкубации можно применять для выделения Т-клеток в том случае, когда имеется небольшое количество Т-клеток по сравнению с другими типами клеток, например, при выделении инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) из опухолевой ткани или у индивидуумов с ослабленным иммунитетом. Кроме того, применение более длительных периодов инкубации может повысить эффективность захвата  $\text{CD8}^+$  Т-клеток. Таким образом, путем простого укорачивания или удлинения периода времени, в течение которого Т-клетки могут связываться с гранулами CD3/CD28, и/или путем увеличения или уменьшения отношения гранул к Т-клеткам (как описано далее в данном документе), субпопуляции Т-клеток могут быть предпочтительно выбраны во время или вплотную по времени к закладке культуры или в другие моменты времени во время процесса. Кроме того, путем увеличения или уменьшения отношения антител анти-CD3 и/или анти-CD28 на гранулах или другой поверхности субпопуляции Т-клеток могут быть предпочтительно выбраны во время или вплотную по времени к закладке культуры или в других желаемых моментах времени. Специалисту в данной области техники будет понятно, что можно применять несколько циклов отбора. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть желательным выполнить процедуру отбора и применить "неотобранные" клетки в процессе активации и размножения. "Неотобранные" клетки также могут быть подвергнуты дальнейшим циклом отбора.

Обогащение популяции Т-клеток путем отрицательного отбора можно выполнить с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отобранных клеток. Один из способов представляет собой сортировку и/или отбор клеток с помощью отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которой применяется смесь из моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на клетках, выбранных отрицательно. Например, чтобы обогатить  $\text{CD4}^+$  клетки путем отрицательного отбора, смесь моноклональных антител, как правило, включает в себя антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть желательным обогащать или положительно отбирать регуляторные Т-клетки, которые обычно экспрессируют  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD25}^+$ ,  $\text{CD62Lhi}$ ,  $\text{GITR}^+$  и  $\text{FoxP3}^+$ . Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-регуляторные клетки истощают с помощью анти-C25-конъюгированных гранул или других подобных методов отбора.

Для выделения желаемой популяции клеток путем положительного или отрицательного отбора концентрация клеток и поверхность (например, частицы, такие как гранулы) могут быть изменены. В

некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть желательным значительное уменьшение объема, в котором гранулы и клетки смешиваются вместе (т.е. увеличение концентрации клеток), с целью обеспечения максимального контакта клеток и гранул. Например, в одном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию 2 миллиарда клеток/мл. В другом варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию более 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения можно применять концентрацию, составляющую 125 или 150 миллионов клеток/мл. Применение высоких концентраций может привести к увеличению количества полученных клеток, активации и размножению клеток. Кроме того, применение высоких концентраций клеток позволяет более эффективно захватывать клетки, которые могут слабо экспрессировать антигены-мишени, представляющие интерес, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или клетки из образцов, в которых присутствует много опухолевых клеток (т.е. лейкозная кровь, опухольная ткань и т.д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность и являются желательными для получения. Например, применение высокой концентрации клеток позволяет более эффективно отбирать CD8<sup>+</sup> Т-клетки, которые обычно характеризуются более низким уровнем экспрессии CD28.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть желательным применение более низких концентраций клеток. Путем существенного разбавления смеси Т-клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы), взаимодействия между частицами и клетками минимизируются. Этот способ выбирают для клеток, которые экспрессируют большое количество желаемых антигенов, связанных с частицами. Например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки экспрессируют более высокие уровни CD28 и более эффективно захватываются, чем CD8<sup>+</sup> Т-клетки в разбавленных концентрациях. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения применяемая концентрация клеток составляет  $5 \times 10^6$ /мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения применяемая концентрация клеток может составлять от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^6$ /мл, а также любое целое значение между ними.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки можно инкубировать на ротаторе в течение различных промежутков времени с изменяющимися скоростями при 2-10°C или при комнатной температуре.

Т-клетки для стимуляции также можно заморозить после этапа промывки. Не желая быть ограниченными какой-либо теорией, считают, что замораживание и последующий этап оттаивания обеспечивают более однородный продукт путем удаления гранулоцитов и в некоторой степени моноцитов в популяции клеток. После этапа промывки, в результате которого удаляется плазма и тромбоциты, клетки можно суспендировать в замороженном растворе. Несмотря на то, что многие растворы и параметры замораживания известны в данной области техники и будут пригодны в этом контексте, один из способов включает в себя применение PBS, содержащего 20% ДМСО и 8% сывороточного альбумина человека, или культуральную среду, содержащую 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% ДМСО, или 31,25% плазмалита-А (Plasmalyte-A), 31,25% декстрозы 5%, 0,45% NaCl, 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% ДМСО или других пригодных сред для замораживания клеток, содержащих, например, Геспан (Hespan) и плазмалит А (PlasmaLyte A), после обработки которыми клетки замораживают до -80°C с интенсивностью 1°/мин и хранят в паровой фазе резервуара для хранения жидкого азота. Можно применять и другие методы контролируемого замораживания, а также неконтролируемое мгновенное замораживание при t -20°C или в жидком азоте.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения криоконсервированные клетки оттаивают и промывают, как описано в данном документе, и оставляют на 1 ч при комнатной температуре перед активацией.

В данном изобретении также рассматривается сбор образцов крови или продукта афереза у субъекта в период времени до того, когда могут понадобиться размноженные клетки, как описано в данном документе. Таким образом, клетки, подлежащие размножению, можно собрать из их источника получения в любой необходимый момент времени, при этом желаемые клетки, такие как Т-клетки, будут выделяться и замораживаться для последующего применения с целью Т-клеточной терапии ряда заболеваний или патологических состояний, при которых будет эффективна Т-клеточная терапия, такая как описанная в данном документе. В одном варианте осуществления данного изобретения образец крови или афереза получают в целом от здорового субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образец крови или афереза получают в целом от здорового субъекта, который подвержен риску развития заболевания, но у которого заболевание еще не развилось, при этом клетки, представляющие интерес, выделяют и замораживают для последующего применения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки можно размножить, заморозить и применять позднее. В некоторых вариантах

осуществления данного изобретения образцы собирают у пациента вскоре после установления диагноза конкретного заболевания, как описано в данном документе, но до применения любого вида лечения. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения клетки выделяют из образца крови или афереза у субъекта до применения любого количества соответствующих способов лечения, включая, но не ограничиваясь ими, лечение такими агентами, как натализумаб, эфализумаб, противовирусные агенты, химиотерапию, радиационное облучение, иммуносупрессивные агенты, такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антитела или другие иммуноаблативные агенты, такие как САМРАТН, антитела анти-CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофенольная кислота, стероиды, FR901228, а также лучевая обработка. Эти препараты ингибируют кальциневрин кальцийзависимую фосфатазу (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназу p70S6, что важно для передачи сигналов, индуцированных фактором роста (рапамицин) (Liu et al., Cell, 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). В дополнительном варианте осуществления данного изобретения клетки выделяют от пациента и замораживают для последующего применения в сочетании с (например, до, одновременно или после) трансплантацией костного мозга или стволовых клеток, Т-клеточной абляционной терапией с применением либо химиотерапевтических агентов, таких как флударабин, наружной дистанционной лучевой терапии (ХРТ), циклофосамида, либо антител, таких как ОКТ3 или САМРАТН. В другом варианте осуществления данного изобретения клетки могут быть заранее выделены и заморожены для последующего применения с целью лечения после В-клеточной абляционной терапии с применением таких агентов, которые реагируют с CD20, например ритуксан.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки получают от пациента непосредственно после лечения. В этом отношении было обнаружено, что после некоторых видов лечения рака, в частности лечения препаратами, которые поражают иммунную систему, вскоре после лечения в ходе периода, когда пациенты обычно восстанавливаются после лечения, качество полученных Т-клеток может быть оптимальным или улучшенным относительно их способности размножаться *ex vivo*. Аналогичным образом, после осуществления процессов *ex vivo* с применением способов, описанных в данном документе, эти клетки могут быть в предпочтительном состоянии, обеспечивающем улучшенное приживание и размножение *in vivo*. Таким образом, в контексте данного изобретения предполагается собирать клетки крови, включая Т-клетки, дендритные клетки или другие клетки гематопозитической линии, во время этой фазы восстановления. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения мобилизацию (например, мобилизация с ГМКСФ) и схемы подготовки к лечению можно применять для создания состояния у субъекта, при котором предпочтение отдается репопуляции, рециркуляции, регенерации и/или размножению конкретных типов клеток, особенно в течение определенного периода времени после терапии. Иллюстративные типы клеток включают Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

## 2. Активация и размножение Т-клеток.

Т-клетки можно активировать и размножить независимо от того, проводить это до или после их генетической модификации с применением CAR, описанных в данном документе, осуществляя указанную активацию и размножение, как правило, с помощью способов, описанных, например, в патенте США № 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041 и в публикации патентной заявки США № 20060121005.

Как правило, Т-клетки можно размножить путем контакта с поверхностью с прикрепленным к ней агентом, который стимулирует сигнал, ассоциированный с комплексом CD3/TCR, и лигандом, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток могут стимулироваться, как описано в данном документе, например, путем приведения в контакт с антителом анти-CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом анти-CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем приведения в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с ионофором кальция. Для костимуляции дополнительной молекулы на поверхности Т-клеток применяется лиганд, который связывает дополнительную молекулу. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом анти-CD3 и антителом анти-CD28 в условиях, пригодных для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации либо CD4<sup>+</sup> Т-клеток, либо CD8<sup>+</sup> Т-клеток, антитела анти-CD3 и антитела анти-CD28 можно применять антитела анти-CD28, примеры которых включают в себя 9,3, В-Т3, XR-CD28 (Diaclone, Безансон, Франция), как и другие известные в данной области техники способы (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Naanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный стимулирующий сигнал и костимулирующий сигнал для Т-клетки можно получить с помощью различных протоколов. Например, агенты, обеспечивающие каждый сигнал, могут находиться в растворе или быть соединены с поверхностью. При соединении с поверхностью агенты могут быть соединены с одной и той же поверхностью (т.е. в форме "цис") или с раздельными поверхностями (т.е. в форме "транс"). В альтернативном варианте один агент может быть связан с поверхностью и с другим агентом в растворе. В одном варианте осуществления данного изобретения агент, обеспечивающий костимулирующий сигнал, связан с поверхностью

клетки, а агент, обеспечивающий первичный активирующий сигнал, находится в растворе или соединен с поверхностью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения оба агента могут находиться в растворе. В другом варианте осуществления данного изобретения агенты могут находиться в растворимой форме, а затем поперечно шиты с поверхностью, такой как клетка, экспрессирующая Fc-рецепторы, или антитело или другой связывающий агент, который будет связываться с агентами. В этой связи см., например, публикации патентных заявок США № 2004/0101519 и 2006/0034810 для искусственных антигенпредставляющих клеток (аАПК), которые предназначены для применения с целью активации и размножения Т-клеток в данном изобретении.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки комбинируют с гранулами, покрытыми агентом, затем гранулы и клетки разделяют, после чего клетки культивируют. В альтернативном варианте осуществления данного изобретения, перед культивированием клетки и гранулы, покрытые агентом, не разделяют, а культивируют вместе. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения гранулы и клетки сначала концентрируют путем применения силы, такой как магнитная сила, что приводит к усиленному лигированию маркеров клеточной поверхности, тем самым индуцируя клеточную стимуляцию.

В качестве примера белки клеточной поверхности можно лигировать, обеспечив контакт парамагнитных гранул, к которым прикреплены анти-CD3 и анти-CD28 (3×28 гранул), с Т-клетками. В одном варианте осуществления данного изобретения клетки (например, от  $10^4$  до  $10^9$  Т-клеток) и гранулы (например, парамагнитные гранулы DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 Т в соотношении 1:1) комбинируют в буфер, предпочтительно PBS (без двухвалентных катионов, таких как кальций и магний). Как и в предыдущем случае, специалисты в данной области техники могут легко оценить, какую концентрацию клеток можно применять. Например, клетки-мишени могут очень редко встречаться в образце и составлять только 0,01% образца или весь образец (т.е. 100%) может состоять из клеток-мишеней, представляющих интерес. Соответственно, для данного изобретения можно применять любое количество клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть желательным значительное уменьшение объема, в котором частицы и клетки смешиваются вместе (т.е. увеличение концентрации клеток), с целью обеспечения максимального контакта клеток и частиц. Например, в одном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию около 2 миллиардов клеток/мл. В другом варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию более 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения можно применять концентрацию, составляющую 125 или 150 миллионов клеток/мл. Применение высоких концентраций может привести к увеличению количества полученных клеток, активации и размножению клеток. Кроме того, применение высоких концентраций клеток позволяет более эффективно захватывать клетки, которые могут слабо экспрессировать антигены-мишени, представляющие интерес, такие как CD28-отрицательные Т-клетки. Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность и являются желательными для получения в некоторых вариантах осуществления данного изобретения. Например, применение высокой концентрации клеток позволяет более эффективно отбирать  $CD8^+$  Т-клетки, которые обычно характеризуются более низким уровнем экспрессии CD28.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения смесь можно культивировать в течение нескольких часов (около 3 ч) до около 14 дней или любого целого значения часа между ними. В другом варианте осуществления данного изобретения смесь можно культивировать в течение 21 дня. В одном варианте осуществления данного изобретения гранулы и Т-клетки культивируют вместе в течение около 8 дней. В другом варианте осуществления данного изобретения гранулы и Т-клетки культивируют вместе в течение 2-3 дней. Также могут потребоваться несколько циклов стимуляции, в результате чего время культивирования Т-клеток может составлять 60 дней или более. Условия, пригодные для культивирования Т-клеток, включают в себя пригодную среду (например, минимальную основную среду или среду RPMI 1640 или X-vivo 15 (Lonza)), которая может содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, фетальную бычью или человеческую сыворотку), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-7, ГМКСФ, IL-10, IL-12, IL-15, TGF $\beta$  и TNF- $\alpha$  или любые другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области техники. Другие добавки для роста клеток включают в себя, но не ограничиваются ими, поверхностно-активное вещество, плазматат и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среда может включать в себя RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-2, X1-Vivo 15 и X-Vivo 20, Optimizer, с добавленными аминокислотами, пируватом натрия и витаминами, без сыворотки или с добавлением соответствующего количества сыворотки (или плазмы) или определенного набора гормонов и/или количества цитокина(ов), достаточного для роста и размножения Т-клеток. Антибиотики, например пенициллин и стрептомицин, включены только в экспериментальные культуры, а не в культуры клеток, которые предназначены для введения субъекту. Клетки-мишени выдерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, на-

пример, при соответствующей температуре (например, 37°C) и в соответствующей атмосфере (например, воздух плюс 5% CO<sub>2</sub>). Т-клетки, подвергшиеся воздействию стимуляции в течение различных периодов времени, могут обладать разными характеристиками. Например, типичные продукты крови или мононуклеарных клеток периферической крови, полученные в результате афереза, имеют популяцию хелперных Т-клеток (ТН, CD4<sup>+</sup>), которая является более численной, чем популяция цитотоксических или супрессорных Т-клеток (ТС, CD8). Размножение Т-клеток *ex vivo* в результате стимуляции рецепторов CD3 и CD28 приводит к продуцированию популяции Т-клеток, которые примерно до 8-9 дней состоят преимущественно из ТН-клеток, тогда как примерно через 8-9 дней популяция Т-клеток включает в себя все более многочисленную популяцию ТС-клеток. Соответственно, в зависимости от цели лечения, может быть предпочтительным введение субъекту популяции Т-клеток, включающей преимущественно ТН-клетки. Аналогичным образом, если выделено антигенспецифическое подмножество ТС-клеток, может быть полезно размножить это подмножество до большей степени.

Кроме того, в дополнение к маркерам CD4 и CD8 другие фенотипические маркеры существенно различаются, но в значительной степени являются воспроизводимыми во время процесса размножения клеток. Таким образом, такая воспроизводимость дает возможность адаптировать активированный продукт Т-клеток для конкретных целей.

#### V. Фармацевтические композиции.

Также в данном изобретении предлагаются фармацевтические композиции, содержащие любое из однодоменных антител (таких как анти-CD19, анти-CD20, анти-BCMA или анти-CD38 sAb) или любую из сконструированных иммунных эффекторных клеток, содержащих любой из CAR, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции можно получить путем смешивания однодоменного антитела или множества сконструированных иммунных эффекторных клеток, обладающих желаемой степенью чистоты, в некоторых случаях в сочетании с фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980)), в виде лиофилизированных препаратов или водных растворов.

Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают в себя буферы, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту, метионин, витамин Е, метабисульфит натрия; консерванты, изотонические вещества, стабилизаторы, комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы); хелатирующие агенты, такие как ЭДТК и/или неионные поверхностно-активные вещества.

Буферы применяют для контроля pH в диапазоне, который оптимизирует терапевтическую эффективность, особенно если стабильность зависит от pH. Буферы предпочтительно присутствуют в концентрациях от около 50 до около 250 мМ. Пригодные буферные агенты для применения по данному изобретению включают в себя как органические, так и неорганические кислоты и их соли, например цитрат, фосфат, сукцинат, тартрат, фумарат, глюконат, оксалат, лактат, ацетат. Кроме того, буферы могут содержать соли гистидина и триметиламина, такие как Трис.

Консерванты добавляются для замедления роста микроорганизмов и обычно присутствуют в диапазоне от 0,2 до 1,0% (мас./об.). Пригодные консерванты для применения по данному изобретению включают в себя хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; галогениды бензалкония (например, хлорид, бромид, йодид), хлорид бензетония; тимеросал, фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол.

Регуляторы тоничности, иногда называемые "стабилизаторами", присутствуют для регулирования или поддержки тоничности жидкости в композиции. При применении с большими заряженными биомолекулами, такими как белки и антитела, регуляторы тоничности часто называют "стабилизаторами", поскольку они могут взаимодействовать с заряженными группами боковых цепей аминокислот, тем самым уменьшая потенциал меж- и внутримолекулярных взаимодействий. Регуляторы тоничности могут присутствовать в любом количестве от 0,1 до 25 мас.%, предпочтительно от 1 до 5 мас.%, с учетом относительных количеств других ингредиентов. Предпочтительные регуляторы тоничности включают в себя многоатомные сахарные спирты, предпочтительно тригидратные или высшие сахарные спирты, такие как глицерин, эритрит, арабитол, ксилит, сорбит и маннит.

Дополнительные вспомогательные вещества включают в себя агенты, которые могут функционировать как одно или большее количество из следующих веществ: (1) объемобразующие агенты, (2) усилители растворимости, (3) стабилизаторы и (4) агенты, предотвращающие денатурацию или прилипание к стенке контейнера. Такие вспомогательные вещества включают в себя многоатомные сахарные спирты (перечисленные выше); аминокислоты, такие как аланин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, лизин, орнитин, лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т.д.; органические сахара или сахарные спирты, такие как сахароза, лактоза, лактит, трегалоза, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, рибитол, миониситоza, мионизитол, галактоза, галактит, глицерин, циклитолы (например, инозит), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстановители, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая

кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин,  $\alpha$ -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; белки с низкой молекулярной массой, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или другие иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды (например, ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза, дисахариды (например, лактоза, мальтоза, сахароза), трисахариды, такие как раффиноза и полисахариды, такие как декстрин или декстран. Неионные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как "смачивающие агенты") содержатся для облегчения солюбилизации терапевтического агента, а также защиты терапевтического белка от агрегации, вызванной перемешиванием, что также позволяет составу подвергаться напряжению поверхности сдвига без инициирования денатурации активного терапевтического белка или антитела. Неионные поверхностно-активные вещества содержатся в диапазоне от около 0,05 до около 1,0 мг/мл, предпочтительно от около 0,07 до около 0,2 мг/мл.

Пригодные неионные поверхностно-активные вещества включают в себя полисорбаты (20, 40, 60, 65, 80 и т.д.), полиоксимеры (184, 188 и т.д.), полиолы PLURONIC®, TRITON®, полиоксиэтиленовые сорбитановые моноэфиры (TWEEN®-20, TWEEN®-80 и т.д.), лауромакрогол 400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиэтилен гидрогенизированное касторовое масло 10, 50 и 60, моностеарат глицерина, сложный эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. Анионные детергенты, которые можно применять, включают в себя лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия. Катионные детергенты включают в себя хлорид бензалкония или хлорид бензетония.

Фармацевтические композиции для введения *in vivo* должны быть стерильными. Стерилизацию фармацевтической композиции можно осуществить путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Как правило, фармацевтические композиции по данному изобретению помещают в контейнер со стерильным входным отверстием, например пакет или флакон для внутривенного раствора с пробкой, прокалываемой иглой для подкожной инъекции.

Путь введения соответствует известным и принятым способам, например однократное или множественное введение болюсной дозы или инфузия в течение длительного периода времени подходящим путем, например инъекция или инфузия с помощью подкожного, внутривенного, внутрибрюшинного, внутримышечного, внутриартериального, внутриочагового или внутрисуставного пути, местное введение, ингаляция или введение с замедленным высвобождением или пролонгированным высвобождением.

Можно изготовить препараты с замедленным высвобождением. Соответствующие примеры препаратов замедленного высвобождения включают в себя полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие антагонист и присутствующие в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают в себя полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и  $\gamma$ -этил-L-глутамата, неразлагающийся этилвинилацетат, разлагающиеся сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и лейпролида ацетата) и поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, также могут содержать более одного активного соединения или агента, необходимого для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно с дополняющими видами активности, которые не оказывают отрицательного влияния друг на друга. В альтернативном или дополнительном варианте композиция может содержать цитотоксический агент, химиотерапевтический агент, цитокин, иммунодепрессант или агент, ингибирующий рост. Такие молекулы могут присутствовать в комбинации в количествах, которые эффективны при применении с предполагаемой целью.

Активные ингредиенты можно включить в микрокапсулы, полученные, например, с помощью метода коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли-(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> edition.

#### VI. Способы лечения рака.

Данное изобретение относится к способам и композициям для применения в клеточной иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клеточная иммунотерапия предназначена для лечения рака, включая, но не ограничиваясь этим, гематологические злокачественные опухоли и солидные опухоли. Любые однодоменные антитела, химерные рецепторы антигенов и сконструированные иммунные эффекторные клетки, описанные в данном документе, можно применять в способе лечения рака. Описанные в данном документе CAR могут быть пригодны для лечения опухолей, характеризующихся мутациями, которые обуславливают продуцирование исчезнувших вариантов антигена, а также для снижения резистентности к существующим способам лечения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения способы и композиции, описанные в данном документе, можно применять

для лечения других заболеваний, которые ассоциированы с антигенами, специфически распознаваемыми однодоменными антителами или CAR, включая, например, аутоиммунные заболевания.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую мультиспецифический (например, биспецифический) химерный рецептор антигенов (CAR), который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с первым антигеном (таким как первый опухолевый антиген), и второе однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся со вторым антигеном (таким как второй опухолевый антиген); (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый антиген отличается от второго антигена; и (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый антиген и/или второй антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb и/или второе sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое однодоменное антитело и второе однодоменное антитело являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифический CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифический CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка являются аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз, такой как множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой солидный рак.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетку), содержащую BCMA $\times$ CD38 CAR, который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий однодоменное антитело анти-BCMA и однодоменное антитело анти-CD38; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен; а также (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb и/или анти-CD38 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения од-

нодомненное антитело анти-BCMA и однодомненное антитело анти-CD38 являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является слитым с анти-CD38 sdAb на N-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является слитым с анти-CD38 sdAb на C-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA $\times$ CD38 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA $\times$ CD38 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодомненное антитело анти-BCMA содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело анти-CD38 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA $\times$ CD38 CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 207-216. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения гемобластоз представляет собой множественную миелому.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей (1) а CD19 $\times$ CD20 CAR, который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий однодомненное антитело анти-CD19 и однодомненное антитело анти-CD20; (б) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен; и (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb и/или анти-CD20 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодомненное антитело анти-CD20 и однодомненное антитело анти-CD20 являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 является слитым с анти-CD20 sdAb на N-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является слитым с анти-CD20 sdAb на C-конце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144-151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В

некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19×CD20 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19×CD20 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения однодоменное антитело анти-CD19 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-CD20 содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19×CD20 CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения гемобластоз представляет собой В-клеточную лимфому.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую поливалентный химерный рецептор антигенов, который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество однодоменных антител (sdAb), специфически связывающихся с антигеном (таким как опухолевый антиген); (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен; а также (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множество sdAb являются верблюдовыми, химерными, человеческими или гуманизированными. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множество однодоменных антител являются слитыми друг с другом посредством пептидных связей или пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 198-201 и 265-270. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная

эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз, такой как множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой солидный рак.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую поливалентный химерный рецептор антигенов, который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело, специфически связывающееся с первым эпитопом антигена (таким как опухолевый антиген), и второе однодоменное антитело, специфически связывающееся со вторым эпитопом антигена; (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп отличается от второго эпитопа; а также (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb и/или второе sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое однодоменное антитело и второе однодоменное антитело являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поливалентный CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз, такой как множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой солидный рак. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую CD19 химерный рецептор антигенов, который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD19 sdAb; (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом анти-CD19 sdAb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7,

LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD19 CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 248. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз, такой как множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой солидный рак.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую CD20 CAR, который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD20 sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен; при этом анти-CD20 sdAb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb дополнительно содержит FR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 244, FR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 245, FR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246, и/или FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 247. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD20 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 249. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD20 CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 249. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз, такой как множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой солидный рак.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей (1) сконструированную иммунную эффектор-

ную клетку (такую как Т-клетка), содержащую CD20 CAR, который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен, и (2) фармацевтически приемлемый носитель, при этом анти-BCMA sdAb содержит любой из следующих элементов:

(23) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29;

(24) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;

(25) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

(26) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

(27) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;

(28) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;

(29) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

(30) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

(31) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37;

(32) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; или

(33) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит домен  $V_{HH}$ , содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 78-88. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из

CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 152-162. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз, такой как множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой солидный рак. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую CD38 CAR, который содержит полипептид, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD38 sdAb; (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен, и (2) фармацевтически приемлемый носитель, при этом анти-BCMA sdAb содержит любой из следующих элементов:

(25) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64;

(26) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65;

(27) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

(28) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67;

(29) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;

(30) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69;

(31) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

(32) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

(33) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72;

(34) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73;

(35) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; или

(36) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD38 sdAb является верблюдовым, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD38 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-100. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов

CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD38 CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 163-174. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз, такой как множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой солидный рак. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения заболевания (такого как рак) у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей однодоменное антитело анти-CD19 и фармацевтически приемлемый носитель, причем однодоменное антитело анти-CD19 содержит три CDR: (a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (b) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и (c) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD19 sdAb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения заболевания (такого как рак) у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей однодоменное антитело анти-CD19 и фармацевтически приемлемый носитель, причем однодоменное антитело анти-CD20 содержит три CDR: (a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (b) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и (c) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления анти-CD20 sdAb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения заболевания (такого как рак) у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей однодоменное антитело анти-BCMA и фармацевтически приемлемый носитель, при этом анти-BCMA sdAb содержит любой элемент из следующих:

(1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29;

(2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;

(3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

(4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

(5) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;

(6) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;

(7) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; CDR2, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

(8) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

(9) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37;

(10) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; или

(11) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 78-88

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения заболевания (такого как рак) у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей однодоменное анти-тело анти-CD38 и фармацевтически приемлемый носитель, при этом анти-CD38 sdAb содержит любой элемент из следующих:

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64;

(1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65;

(2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

(3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67;

(4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;

(5) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69;

(6) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

(7) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

(8) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72;

(9) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73;

(10) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; или

(11) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-CD38 sdAb содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-100.

Способы, описанные в данном документе, пригодны для лечения различных видов рака, включая как солидный рак, так и гемобласты. Способы применимы к ракам всех стадий, включая раннюю стадию, позднюю стадию и метастатический рак. Способы, описанные в данном документе, можно приме-

нять в качестве первой линии терапии, второй линии терапии, третьей линии терапии или комбинированной терапии с другими способами лечения рака, известными в данной области техники, такими как химиотерапия, хирургическое лечение, облучение, генная терапия, иммунотерапия, трансплантация костного мозга, трансплантация стволовых клеток, таргетная терапия, криотерапия, ультразвуковая терапия, фотодинамическая терапия, радиочастотная абляция или тому подобное, в режиме адьювантного или неоадьювантного лечения.

Введение фармацевтических композиций можно осуществлять любым удобным способом, в том числе с помощью инъекций, приема внутрь, трансфузии, имплантации или трансплантации. Композиции можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, внутривожно, внутривохолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, внутривенно или внутривошинно. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтическую композицию вводят системно. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтическую композицию вводят индивидууму путем инфузии, такой как внутривенная инфузия. Инфузионные методики для иммунотерапии хорошо известны в данной области техники (см., например, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676 (1988)). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтическую композицию вводят индивидууму путем внутривожной или подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиции вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиции вводят непосредственно в опухоль или лимфатический узел. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтическую композицию вводят местно в область опухоли, например, непосредственно в опухолевые клетки, или ткани, имеющие опухолевые клетки.

Множественная миелома (ММ) представляет собой неизлечимую агрессивную злокачественную опухоль плазмы, которая классифицируется как неоплазия В-клеток и неконтролируемо пролиферирует в костном мозге, препятствуя нормальному метаболическому продуцированию клеток крови и обуславливая болезненные поражения костей (Garfall, A.L. et al., *Discovery Med.* 2014, 17, 37). Клинически множественная миелома может проявляться гиперкальциемией, почечной недостаточностью, анемией, костными поражениями, бактериальными инфекциями, повышенной вязкостью крови и амилоидозом (Robert Z. Orlowski, *Cancer Cell.* 2013, 24(3)). Согласно исследованиям и статистике, ежегодно миелома диагностируется у около 86000 пациентов, при этом около 63000 пациентов ежегодно умирают от осложнений, ассоциированных с этой патологией (Becker, 2011). Кроме того, из-за старения населения прогнозируется, что число случаев миеломы будет возрастать из года в год. Как и для многих видов рака, относительно множественной миеломы остается неизвестной причина заболевания и не разработано эффективное лечение. Некоторые способы лечения множественной миеломы являются аналогичными лечению других видов рака, например, химиотерапия или лучевая терапия, трансплантация стволовых клеток или трансплантация костного мозга, таргетная терапия или биологическая терапия (George, 2014). Клеточная иммунотерапия на основе антител продемонстрировала существенную клиническую эффективность у пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями, особенно при В-клеточной неходжкинской лимфоме. Существует потребность в эффективном иммунотерапевтическом агенте для лечения множественной миеломы.

Дозы и необходимая концентрация лекарственного средства в фармацевтических композициях по данному изобретению могут варьироваться в зависимости от конкретного применения. Способы определения соответствующей дозы или пути введения хорошо известны квалифицированному специалисту. Эксперименты на животных обеспечивают надежные рекомендации для определения эффективных доз для лечения человека. Межвидовое приведение эффективных доз можно выполнить согласно принципам, изложенным в Mordenti, J. and Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics", In *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1989, p. 42-46. В рамках данного изобретения для различных способов лечения и при различных нарушениях будут эффективными различные составы, при этом введение, применяемое при лечении конкретного органа или ткани, может потребовать доставки с помощью способа, отличного от другого способа, с помощью которого необходимо доставить состав к другому органу или ткани.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, в которых фармацевтическая композиция содержит любое однодоменное антитело, описанное в данном документе, указанную фармацевтическую композицию вводят в дозе от около 10 нг/кг до около 100 мг/кг веса тела индивидуума или более в сутки, например, от около 1 до 10 мг/кг/сут, в зависимости от пути введения. Рекомендации по конкретным дозам и способам доставки представлены в литературе; см., например, в патентах США № 4657760; 5206344 или 5225212.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, в которых фармацевтическая композиция содержит любую из сконструированных иммунных клеток, описанных в данном документе, указанную фармацевтическую композицию вводят в дозе по меньшей мере около  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  или  $10^9$  клеток/кг веса тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанную фармацевтическую композицию вводят в дозе по меньшей мере от около 10 до около  $10^5$ , от около  $10^5$  до около  $10^6$ , от около  $10^6$  до около  $10^7$ , от около  $10^7$  до около  $10^8$ , от около  $10^8$  до около  $10^9$ ,

от около  $10^4$  до около  $10^9$ , от около  $10^4$  до около  $10^6$ , от около  $10^6$  до около  $10^8$  или от около  $10^5$  до около  $10^7$  клеток/кг веса тела индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанную фармацевтическую композицию вводят один раз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанную фармацевтическую композицию вводят множество раз (например, 2, 3, 4, 5, 6 или большее количество раз). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанную фармацевтическую композицию вводят один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели, один раз в месяц, один раз в 2 месяца, один раз в 3 месяца, один раз в 4 месяца, один раз в 5 месяцев, один раз в 6 месяцев, один раз в 7 месяцев, один раз в 8 месяцев, один раз в 9 месяцев или один раз в год. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения интервал между введениями составляет от около 1 до 2 недель, от 2 недель до 1 месяца, от 2 недель до 2 месяцев, от 1 до 2 месяцев, от 1 до 3 месяцев, от 3 до 6 месяцев или от 6 месяцев до года. Специалист в области медицины может легко определить оптимальную дозу и схему лечения для конкретного пациента путем мониторинга за симптомами заболевания и соответствующей коррекции лечения у данного пациента.

Кроме того, дозы можно вводить посредством одного или большего количества отдельных введений или путем непрерывной инфузии. При повторном введении в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до желаемого подавления симптомов заболевания. Однако можно использовать и другие схемы введения доз. Эффективность лечения можно контролировать с помощью обычных методик и анализов.

#### VII. Наборы и готовые изделия.

В данном изобретении дополнительно предлагаются наборы, единичные дозы и готовые изделия, содержащие какие-либо однодоменные антитела, химерные рецепторы антигенов или сконструированные иммунные эффекторские клетки, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается набор, который содержит любую из описанных в данном документе фармацевтических композиций, и предпочтительно предлагаются инструкции для его применения.

Наборы по данному изобретению находятся в пригодной упаковке. Пригодная упаковка включает в себя, но не ограничивается этим, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и т.п. В некоторых случаях наборы могут содержать дополнительные компоненты, такие как буферы и пояснительную информацию. Таким образом, в данном изобретении также предлагаются готовые изделия, которые включают в себя флаконы (например, герметичные флаконы), бутылки, банки, гибкую упаковку и т.п.

Готовое изделие может содержать контейнер и связанную с контейнером или находящуюся на нем этикетку или листок-вкладыш в упаковку. Пригодные контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.п. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Как правило, контейнер содержит композицию, эффективно применяемую при лечении заболевания или нарушения (такого как рак), описанного в данном документе, и может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожной инъекции). На этикетке или на листке-вкладыше в упаковке указано, что композицию применяют для лечения конкретного патологического состояния у индивидуума. Этикетка или листок-вкладыш в упаковке должны дополнительно содержать инструкции по введению композиции индивидууму. На этикетке могут содержаться указания относительно восстановления и/или применения. Контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, может быть многоразовым флаконом, который допускает повторные введения (например, от 2-6 введений) восстановленной композиции. В листке-вкладыше в упаковку приводятся инструкции, в обычном порядке включаемые в коммерческие упаковки терапевтических средств, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозах, введении, противопоказаниях и/или предостережениях, касающихся применения таких терапевтических средств. В дополнение к этому, готовое изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буферный раствор, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Готовое изделие может включать в себя другие материалы, желательные с коммерческой и потребительской точки зрения, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Наборы или готовое изделие могут включать в себя множество единичных доз фармацевтической композиции и инструкции по применению, упакованные в количествах, достаточных для хранения и применения в аптеках, например, в аптеках при клиниках и аптеках, имеющих рецептурно-производственный отдел.

Примеры и типовые варианты осуществления данного изобретения, приведенные ниже, предназначены только для иллюстративных целей и поэтому не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение каким-либо образом. Таким образом, следующие примеры и подробное описание предлагаются в качестве иллюстрации, а не для ограничения.

#### Типовые варианты осуществления данного изобретения

Вариант осуществления 1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагает-

ся химерный рецептор антигенов (CAR), содержащий полипептид, который содержит (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с первым антигеном, и второе однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся со вторым антигеном; (b) трансмембранный домен и (c) внутриклеточный сигнальный домен.

Вариант осуществления 2. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 1 первый антиген отличается от второго антигена.

Вариант осуществления 3. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 2 CAR является мультиспецифическим.

Вариант осуществления 4. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 3 CAR является биспецифическим.

Вариант осуществления 5. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 1-4 первое sdAb расположено на N-конце второго sdAb.

Вариант осуществления 6. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 1-4 первое sdAb расположено на C-конце второго sdAb.

Вариант осуществления 7. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 1-6 первый антиген и второй антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77.

Вариант осуществления 8. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 7 первое sdAb представляет собой анти-BCMA sdAb.

Вариант осуществления 9. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 7 первое sdAb представляет собой анти-CD38 sdAb.

Вариант осуществления 10. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 7 первое sdAb представляет собой анти-CD19 sdAb.

Вариант осуществления 11. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 7 первое sdAb представляет собой анти-CD20 sdAb.

Вариант осуществления 12. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 7 первое sdAb представляет собой анти-CD22 sdAb.

Вариант осуществления 13. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 8 CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий по меньшей мере две копии анти-BCMA sdAb.

Вариант осуществления 14. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 9 CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий по меньшей мере две копии анти-CD38 sdAb.

Вариант осуществления 15. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 8 или по варианту осуществления 9, первое sdAb представляет собой анти-BCMA sdAb, а второе sdAb представляет собой анти-CD38 sdAb.

Вариант осуществления 16. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 8 или по варианту осуществления 10, первое sdAb представляет собой анти-BCMA sdAb, а второе sdAb представляет собой анти-CD19 sdAb.

Вариант осуществления 17. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 10 или по варианту осуществления 11 первое sdAb представляет собой анти-CD19 sdAb, а второе sdAb представляет собой анти-CD20 sdAb.

Вариант осуществления 18. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 10 или по варианту осуществления 12 первое sdAb представляет собой анти-CD19 sdAb, а второе sdAb представляет собой анти-CD22 sdAb.

Вариант осуществления 19. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 1-14 первый антиген является таким же, как и второй антиген.

Вариант осуществления 20. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 19 CAR является двухвалентным или трехвалентным.

Вариант осуществления 21. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 19 или по варианту осуществления 20 первое sdAb и второе sdAb специфически связываются с одним и тем же эпитопом.

Вариант осуществления 22. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 21 первое sdAb является таким же, как второе sdAb.

Вариант осуществления 23. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 19 или по варианту осуществления 20 первое sdAb и второе sdAb специфически связываются с различными эпитопами.

Вариант осуществления 24. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 8, 13, 15, 16 и 19-23 анти-BCMA sdAb содержит любую из следующих областей:



тельность SEQ ID NO: 71;

(9) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72;

(10) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73;

(11) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; или

(12) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

Вариант осуществления 27. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 26 анти-CD38 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-100.

Вариант осуществления 28. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 10 и 16-23 анти-CD19 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 29. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 28 анти-CD19 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

Вариант осуществления 30. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 11, 17 и 19-23 анти-CD20 sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 31. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 30 анти-CD20 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

Вариант осуществления 32. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 1-31 первое sdAb и/или второе sdAb являются верблюдовыми, химерными, человеческими или гуманизированными.

Вариант осуществления 33. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 1-32 первое sdAb и второе sdAb являются непосредственно слитыми друг с другом с помощью пептидной связи.

Вариант осуществления 34. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 1-32 первое sdAb и второе sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидного линкера.

Вариант осуществления 35. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 34 пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 аминокислот.

Вариант осуществления 36. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 35 пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 144-151.

Вариант осуществления 37. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело анти-CD19 (sdAb), содержащее CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 38. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 37 анти-CD19 sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

Вариант осуществления 39. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается химерный рецептор антигенов, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD19 sdAb по варианту осуществления 37 или по варианту осуществления 38; (b) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен.

Вариант осуществления 40. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается однодоменное антитело (sdAb) анти-CD20, содержащее CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 41. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения



тельность SEQ ID NO: 67;

(5) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;

(6) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69;

(7) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

(8) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

(9) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72;

(10) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73;

(11) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; или

(12) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

Вариант осуществления 47. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 46 анти-BCMA sdAb содержит домен V<sub>H</sub>H, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 89-100.

Вариант осуществления 48. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается химерный рецептор антигенов, содержащий (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-CD38 sdAb по варианту осуществления 46 или по варианту осуществления 47; (б) трансмембранный домен и (с) внутриклеточный сигнальный домен.

Вариант осуществления 49. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 1-36, 39, 42, 45 и 48 трансмембранный домен получен из молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1.

Вариант осуществления 50. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 49 трансмембранный домен получен из CD8 или CD28.

Вариант осуществления 51. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 50 трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132 или SEQ ID NO: 133.

Вариант осуществления 52. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 1-36, 39, 42, 45 и 48-51 внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки.

Вариант осуществления 53. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 52 первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ .

Вариант осуществления 54. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 53 внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140 или SEQ ID NO: 141.

Вариант осуществления 55. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 1-36, 39, 42, 45 и 48-54 внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен.

Вариант осуществления 56. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 55 костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций.

Вариант осуществления 57. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 56 костимулирующий сигнальный домен содержит цитоплазматический домен CD28 и/или цитоплазматический домен CD137.

Вариант осуществления 58. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 57 костимулирующий сигнальный домен содержит аминокислот-

ную последовательность SEQ ID NO: 136 и/или SEQ ID NO: 137.

Вариант осуществления 59. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 1-36, 39, 42, 45 и 48-58 CAR дополнительно содержит шарнирный домен, расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена.

Вариант осуществления 60. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 59 шарнирный домен получен из CD8 $\alpha$ .

Вариант осуществления 61. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 60 шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130.

Вариант осуществления 62. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 1-36, 39, 42, 45 и 48-61 CAR дополнительно содержит сигнальный пептид, расположенный на N-конце полипептида.

Вариант осуществления 63. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 62 сигнальный пептид получен из молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8, ГМКСФ-рецептора  $\alpha$  и тяжелой цепи IgG1.

Вариант осуществления 64. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 63 сигнальный пептид получен из CD8 $\alpha$ .

Вариант осуществления 65. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 64 сигнальный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127.

Вариант осуществления 66. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается химерный рецептор антигенов, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 152-174, 198-201, 206-216, 248-249, 257-260 и 265-270.

Вариант осуществления 67. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 76-100, 152-174, 198-201, 206-216, 248-249, 257-260 и 265-270.

Вариант осуществления 68. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR по любому из вариантов осуществления 1-36, 39, 42, 45 и 48-66.

Вариант осуществления 69. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 68 последовательность нуклеиновой кислоты выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 175-197, 202-205, 217-227, 250-251, 261-264 и 271-276.

Вариант осуществления 70. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 68 или по варианту осуществления 69 выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность второй нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую CAR, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, функционально связана с последовательностью второй нуклеиновой кислоты посредством последовательности третьей нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид.

Вариант осуществления 71. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 70 саморасщепляющийся пептид выбирают из группы, состоящей из T2A, P2A и F2A.

Вариант осуществления 72. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 71 последовательность третьей нуклеиновой кислоты представляет собой SEQ ID NO: 255.

Вариант осуществления 73. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 68-72 выделенная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК.

Вариант осуществления 74. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 68-72.

Вариант осуществления 75. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 74 вектор представляет собой экспрессионный вектор.

Вариант осуществления 76. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 74 или по варианту осуществления 75 вектор представляет собой вирусный вектор.

Вариант осуществления 77. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 76 вектор представляет собой лентивирусный вектор.

Вариант осуществления 78. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка, содержащая CAR по любому из вариантов осуществления 1-36, 39, 42, 45 и 48-66, и выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществе-

ствления 68-73, или вектор по любому из вариантов осуществления 74-77.

Вариант осуществления 79. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 78 иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку.

Вариант осуществления 80. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 79 иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку.

Вариант осуществления 81. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая сконструированную иммунную эффекторную клетку по любому из вариантов осуществления 78-80, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 82. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции по варианту осуществления 81.

Вариант осуществления 83. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 82 сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной.

Вариант осуществления 84. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 82 сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной.

Вариант осуществления 85. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 82-84 рак представляет собой гемобластоз.

Вариант осуществления 86. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 85 рак представляет собой множественную миелому, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз.

Вариант осуществления 87. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по любому из вариантов осуществления 82-84 рак представляет собой солидный рак.

Вариант осуществления 88. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая анти-CD19 sAb по варианту осуществления 37 или по варианту осуществления 38, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 89. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая анти-CD20 sAb по варианту осуществления 40 или по варианту осуществления 41, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 90. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая анти-BCMA sAb по варианту осуществления 43 или по варианту осуществления 44, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 91. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая анти-CD38 sAb по варианту осуществления 46 или по варианту осуществления 47, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 92. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения заболевания у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 88-91.

Вариант осуществления 93. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения по варианту осуществления 92 заболевание представляет собой рак.

### Примеры

Приведенные в данном документе примеры не предназначены для представления того, что эксперименты, приведенные ниже, это все эксперименты, которые проводились. Предприняты меры для обеспечения точности в отношении применяемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но следует учитывать наличие некоторых экспериментальных погрешностей и отклонений. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Получение однодоменных антител.

С целью разработки однодоменных антител с высокой аффинностью связывания с указанными антигенами иммунизировали лам и создавали библиотеку фагового дисплея для идентификации лидеров V<sub>H</sub>H. Отдельные клоны произвольно собирали и классифицировали в соответствии с определяющей комплементарностью областью 3 (CDR3) тяжелой цепи, которая может играть важную роль в связывании антигена.

Для получения однодоменных антител, лам регулярно иммунизировали соответствующими иммуногенами, которые могли включать в себя рекомбинантный белок BCMA человека, имеющий С-концевой Fc-тег (ACRO Biosystems, Cat No.: BC7-H5254), рекомбинантный белок CD38 человека, имеющий С-концевой His-тег (ACRO Biosystems, Cat No.: CD8-H5224), рекомбинантный белок CD19 человека, имеющий С-концевой Fc-тег (ACRO Biosystems, Cat No.: CD9-H5229) и рекомбинантный белок CD20 человека, имеющий С-концевой Fc-тег (ACRO Biosystems, Cat No.: CD0-H526a).

Ниже описан способ получения однодоменных антител анти-BCMA в качестве примера получения однодоменных антител против различных антигенов. Генерирование однодоменных антител против CD38 человека, против CD19 человека и против CD20 проводили с помощью аналогичных процессов, как описано ниже. Другие протоколы получения однодоменных антител описаны в литературе. См., например, Els Pardon et al., *Nature Protocol*, 2014; 9(3):674.

## 1. Иммунизация животных и анализ иммунного ответа.

### 1.1. Иммунизация животных.

Каждый иммуноген, содержащий рекомбинантный антигенный белок, смешивали с адьювантом или PBS и вводили ламе. Животных иммунизировал представитель компании-поставщика (Cedarline) семь раз, как правило, применяя каждый раз 200 мкг иммуногена и CFA (полный адьювант Фрейнда) с интервалом от 1 до 2 недель. Образцы периферической крови собирали на этапе предварительной иммунизации и после 5- и 7-й иммунизаций. После нескольких циклов иммунизации у лам оценивали иммунные ответы на целевой антиген с целью определения титра антигенспецифических однодоменных антител. Лимфоциты выделяли с помощью градиентного центрифугирования из около 100 мл периферической крови. Клетки дополняли RNALATER и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Сыворотки получали с помощью центрифугирования образцов антикоагулированной крови и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 1.2. Фракционирование IgG.

Фракционирование IgG на подклассы проводили согласно типовой рабочей инструкции GenScript. Подклассы IgG фракционировали из сыворотки терминальной крови с применением ионитов Protein G и Protein A. Образец 1 мл сыворотки помещали в колонку 1 мл HITRAP® Protein G HP и промывали колонку с помощью 10 мл фосфатного буфера (20 mM, pH 7,0). Фракцию IgG3 (MM 100000 Da) элюировали с помощью 0,15 M NaCl, 0,58% уксусной кислотой (pH 3,5) и нейтрализовали элюат с помощью 1 M Трис-HCl (pH 9,0) до pH 7,4. Затем фракцию IgG1 (MM 170,000 Da) элюировали с помощью 0,1 M глицин-HCl (pH 2,7) и нейтрализовали элюат с помощью 1 M Трис-HCl (pH 8,5) до pH 7,4. Фильтрат колонки HITRAP® Protein G HP помещали в колонку 1 мл HITRAP® Protein A HP и промывали колонку с помощью 10 мл фосфатного буфера (20 mM, pH 7,0). Фракцию IgG2 (MM 10000 Da) элюировали с помощью 0,15 M NaCl, 0,58% уксусной кислотой (pH 4,5) и нейтрализовали элюат с помощью 1 M Трис-HCl (pH 9,0) до pH 7,4. Концентрации очищенных антител IgG1, IgG2 и IgG3 определяли с помощью OD280, а степень чистоты каждого из них оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях.

### 1.3. Анализ иммунного ответа.

Иммунный ответ у лам оценивали с помощью ELISA, в котором образцы сыворотки и очищенные IgG анализировали на предмет связывания с иммобилизованными иммуногенами. Оценивали образцы сывороток, собранные перед иммунизацией, после 5-й иммунизации и полученные из терминальной крови. Антиген (т.е. рекомбинантный белок антигена человека) разбавляли в покрывающем буфере при концентрации 4 мкг/мл. Микротитровальный планшет покрывали разбавленным антигеном при  $4^{\circ}\text{C}$  на ночь. Затем планшет промывали 3 раза промывочным буфером с последующим блокированием при комнатной температуре в течение 2 ч. После этого планшет промывали 4 раза промывочным буфером. Серии разбавленных сывороток или IgG добавляли на планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Затем планшет промывали 4 раза промывочным буфером HRP-конъюгированное вторичное антитело против ламуса IgG добавляли на планшета инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывания в каждую лунку добавляли субстрат ТМБ и инкубировали в течение 10 мин перед остановкой с помощью 1 M HCl. Для количественного определения связывания поглощение для каждой лунки измеряли при 450 нм с помощью спектрометра МКЗ.

## 2. V<sub>H</sub>H конструкция библиотеки фаговых дисплеев.

### 2.1. Экстракция РНК.

Общую РНК экстрагировали из изолированных лимфоцитов (из 1.1.1) с помощью реагента TRIZOL® согласно протоколу изготовителя. Количество и качество общей РНК оценивали с помощью гель-электрофореза и определяли количественно путем измерения поглощения при OD260/280.

### 2.2. от-ПЦР и амплификация V<sub>H</sub>H.

Общую РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с применением олиго(dT)<sub>20</sub> праймера с помощью набора для синтеза 1-й цепи кДНК PRIMESCRIPT™ согласно протоколу производителя. Для усиления фрагментов V<sub>H</sub>H разработаны шесть прямых и два обратных специфических вырожденных праймера, которые имели два участка рестрикции BglI. Фрагменты V<sub>H</sub>H амплифицировали согласно типовой рабочей инструкции (SOP) GenScript, как описано ниже.

Вариабельные области тяжелой цепи иммуноглобулина (т.е. V<sub>H</sub>H) амплифицировали с помощью двухэтапной полимеразной цепной реакции (ПЦР). В первой ПЦР 100 нг матрицы кДНК смешивали с праймерами CALL001 (SEQ ID NO: 229) и CALL002 (SEQ ID NO: 230). Продукты ДНК из первой реакции ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. После выделения из геля продукты ДНК первой ПЦР применяли в качестве матриц во второй ПЦР. Вторую ПЦР выполняли с праймерами BACK-1 (SEQ ID NO: 231), BACK-2 (SEQ ID NO: 232) и PMCF (SEQ ID NO: 233). Амплифицированные

продукты второй ПЦР содержащие ПЦР-фрагменты  $V_{H}H$ , выделяли из геля и расщепляли с помощью фермента, а затем вводили в плазмиды фагмидов. Рекомбинантные плазмиды с фрагментами гена  $V_{H}H$  с помощью электрической силы переносили в клетки *E. coli* для создания фагового дисплея иммунной библиотеки  $V_{H}H$ .

Процедура реакции ПЦР имеет начальный этап денатурации при 94°C в течение 7 мин, с последующими 30 циклами при 94°C в течение 1 мин, 55°C в течение 1 мин и 72°C в течение 1 мин; после этого - конечный этап удлинения при 72°C в течение 7 мин.

### 2.3. Конструкция фаговой библиотеки.

Продукты ПЦР  $V_{H}H$  получали путем амплификации с применением различных пар праймеров. Затем продукты ПЦР расщепляли с помощью BglI и выделяли из геля. Выделенные из геля фрагменты вставляли в фагмидный вектор собственной разработки GenScript. Для оптимизации условий лигирования и трансформации сконструировали экспериментальную библиотеку. Для разработки библиотеки фагмидов применяли оптимизированные условия лигирования и трансформации. Небольшую часть трансформированных клеток разбавляли и просеивали на 2×YT планшетах, дополненных 100 мкг/мл ампициллина. С целью расчета размера библиотеки колонии подсчитывали. Для оценки качества библиотеки случайным образом выбирали и секвенировали положительные клоны. Остальные трансформированные клетки просеивали на планшетах YT, дополненных 100 мкг/мл ампициллина и 2% глюкозы. "Газоны" колоний соскабливали с планшетов. Для выделения плазмиды из библиотеки применяли небольшую аликвоту клеток. Остальные клетки дополняли глицерином и хранили при -80°C в качестве запаса.

## 3. Пэннинг фагового дисплея.

### 3.1. Био-пэннинг

Сконструированную фаговую библиотеку  $V_{H}H$  подвергали пэннингу на предмет рекомбинантного белка ВСМА человека и клеток СНО, экспрессирующих ВСМА человека (т.е. СНО-ВСМА, собственной разработки компании Legend Biotec) соответственно, пользуясь типовой рабочей инструкцией, разработанной компанией GenScript. Запас библиотеки выращивали до логарифмической фазы, после чего библиотеку освобождали с помощью фага-хелпера M13KO7 и амплифицировали в течение ночи при 25°C в шейкере. Затем фаг осаждали с помощью PEG/NaCl, снова суспендировали в PBS и хранили при -80°C. Для твердофазного пэннинга лунки микропланшета покрывали рекомбинантным белком ВСМА человека в PBS при 4°C на ночь. Для жидкофазного пэннинга клетки СНО-ВСМА блокировали с помощью блокирующего буфера при комнатной температуре в течение 1 ч. На этапе покрытия или блокирования фаговые частицы предварительно инкубировали с блокирующим буфером и контрольным белком Fc в лунках микропланшета. После предварительной инкубации фаговые частицы добавляли в лунки, покрытые белками ВСМА или раствором СНО-ВСМА, и инкубировали в течение 1 ч. После инкубации несвязанные и неспецифически связанные фаги вымывали путем шестиразового промывания лунок или клеток СНО-ВСМА с помощью PBST с двумя дополнительными промываниями с помощью PBS. Связанные фаговые частицы элюировали с помощью 100 мМ триэтиламина (ТЭА), а элюат нейтрализовали с помощью 1 М Трис-HCl (pH 7,4). Половину элюата затем применяли для инфицирования экспоненциально растущих TG1 клеток *E. coli* ( $OD_{600}=0,4-0,6$ ) для выходного титрования.

### 3.2. Анализ ELISA для фага.

Анализ ELISA для фага проводили с целью идентификации клонов, специфичных для антигенмишеней. Отдельные клоны полученного фага выращивали в 96-луночном планшете и освобождали с помощью фага-хелпера M13KO7 в течение ночи. Для идентификации клонов, которые связываются с белками антигена, 96-луночные микротитровальные планшеты для ELISA покрывали рекомбинантным белком ВСМА человека и контрольным белком Fc соответственно в покрывающем буфере в течение ночи при 4°C, после чего планшеты блокировали с помощью блокирующего буфера. После блокирования на планшеты добавляли около 50 мкл на лунку фагового супернатанта из культуры клеток, выращенной в течение ночи, для 1,5-часовой инкубации при 4°C. Планшеты промывали четыре раза и добавляли на планшеты конъюгированное с HRP моноклональное антитело анти-M13 для 45-минутной инкубации при 4°C. Планшеты снова промывали пять раз и в лунки добавляли раствор субстрата для созревания. Для каждой лунки измеряли абсорбцию при 450 нм.

Для идентификации клонов, которые связывают клетки СНО-ВСМА, клетки СНО-ВСМА блокировали с помощью блокирующего буфера при комнатной температуре в течение 1 ч. После блокирования к растворам клеток добавляли около 20 мкл на лунку фагового супернатанта из культуры клеток, выращенной в течение ночи, для 1-часовой инкубации при комнатной температуре. После четырехразового промывания клеток конъюгированное с HRP моноклональное антитело анти-M13 добавляли для 30-минутной инкубации при комнатной температуре. Клетки промывали пять раз и после этого добавляли раствор субстрата для созревания. Абсорбцию измеряли при 450 нм. После пэннинга идентифицировали положительные одиночные клоны в анализе ELISA для фага и из полученного фага готовили ДНК с помощью наборов для экстракции плазмид. Вставки в плаزمиде секвенировали. Для каждого антигенамишени получали одну или большее количество последовательностей  $V_{H}H$ , см., например, табл. 2.

Пример 2. Получение моноспецифических химерных антигенных рецепторов  $V_{H}H$ .

Каркасная последовательность CAR, кодирующая каркасный полипептид CAR, содержит от N-конца до C-конца шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD28, цитоплазматический домен CD28, цитоплазматический домен CD137 и цитоплазматический домен CD3 $\zeta$ , которые химически синтезированы и клонированы в предварительно модифицированный лентивирусный вектор, расположенный по ходу транскрипции, и функционально связаны с конститутивным hEF1 $\alpha$ -промотором. Полученный каркасный вектор CAR был назван "PLLV-hEF1 $\alpha$ -8281373". Множественные сайты клонирования (MCS) в векторе позволили вставить последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность Kozak (SEQ ID NO: 26), функционально связанную с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , слитый с N-концом фрагмента V<sub>H</sub>H с вектором PLLV-hEF1 $\alpha$ -8281373, расположенным против хода транскрипции и функционально связанным с каркасной последовательностью CAR.

Для построения моноспецифического CAR, имеющего одиночный домен V<sub>H</sub>H, с помощью каркаса PLLV-hEF1 $\alpha$ -8281373 последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую домен V<sub>H</sub>H, функционально связывали с 3'-нуклеотидной последовательностью, кодирующей сигнальный пептид CD8 $\alpha$ . Последовательность слитой нуклеиновой кислоты химически синтезировали и клонировали в каркас PLLV-hEF1 $\alpha$ -8281373 CAR посредством участков рестрикции EcoRI (SEQ ID NO: 234: 5'-GAATTC-3') и SpeI (SEQ ID NO: 235: 5'-ACTAGT-3') с помощью молекулярных методов клонирования, известных в данной области техники. В табл. 4 перечислены векторы, которые были сконструированы для экспрессии типовых моноспецифических, моновалентных анти-BCMA и анти-CD38 CAR.

Для удобства дальнейшего встраивания дополнительных последовательностей, таких как нуклеотид, кодирующий второй V<sub>H</sub>H, при проектировании конструкции моноспецифического CAR (например, анти-BCMA или анти-CD38), участки рестрикции, включая HpaI (SEQ ID NO: 236: 5'-GTTAAC-3'), MluI (SEQ ID NO: 237: 5'-ACGCGT-3'), NsiI (SEQ ID NO: 238: 5'-ATGCAT-3') участки, были включены между последовательностью нуклеиновой кислоты сигнального пептида CD8 $\alpha$  и последовательностью нуклеиновой кислоты V<sub>H</sub>H.

Упакованную смесь плазмид лентивируса, включающую pCMV- $\Delta$ R-8,74 и pMD2. G (Addgene # 12259), предварительно смешивали с векторами PLLV-hEF1 $\alpha$ -8281373, имеющими фрагменты V<sub>H</sub>H (табл. 4) в предварительно оптимизированном соотношении с полиэфириимидом (PEI), затем надлежащим образом перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем трансфекционную смесь добавляли по каплям к клеткам HEK293 и осторожно перемешивали. Затем клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе для клеток при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> Супернатанты собирали после центрифугирования при 4°C, 500 г в течение 10 мин.

Вирусосодержащие супернатанты фильтровали через 0,45 мкм PES-фильтр с последующим ультрацентрифугированием для концентрирования лентивирусов. После ультрацентрифугирования супернатанты осторожно отделяли, а вирусные гранулы аккуратно ополаскивали предварительно охлажденным DPBS. Вирус надлежащим образом аликвотировали, а затем сразу же замораживали для хранения при -80°C. Титр вируса определяли на основании р24 с помощью набора HTRF, разработанного компанией GenScript.

#### Получение МКПК.

Лейкоциты собирали из здоровых доноров путем афереза и доводили концентрацию клеток до  $5 \times 10^6$  клеток/мл в среде R10. Затем лейкоциты смешивали с 0,9% раствором NaCl при соотношении 1:1(об./об.). В 15 мл центрифужную пробирку добавляли 3 мл среды Lymphoprep и медленно добавляли 6 мл разбавленной смеси лимфоцитов на поверхность среды Lymphoprep. Смесь лимфоцитов центрифугировали при 800 г в течение 30 мин без перерывов при 20°C. Затем лимфоцитарную пленку собирали с помощью пипетки 200 мкл. Собранную фракцию разбавляли по меньшей мере в 6 раз 0,9% NaCl или R10 для уменьшения плотности раствора Собранную фракцию затем центрифугировали при 250 г в течение 10 мин при 20°C. Супернатант полностью аспирировали и к осадку клеток добавляли 10 мл R10 для ресуспендирования клеточного осадка. Смесь затем центрифугировали при 250 г в течение 10 мин при 20°C. Супернатант снова аспирировали. В осадок клеток добавляли 2 мл предварительно нагретого до 37°C R10 с 100 МЕ/мл IL-2 и клеточный осадок деликатно ресуспендировали. Число клеток определяли после окрашивания трипановым синим, и этот образец МКПК был готов для последующих экспериментов.

#### Очистка Т-клеток.

Т-клетки человека очищали от МКПК с помощью набора для выделения Т-клеток Miltenyi Pan (Miltenyi Pan T cell isolation kit) (Cat # 130-096-535) согласно протоколу производителя, как описано ниже. В первую очередь определяли число клеток и суспензию клеток центрифугировали при 300 г в течение 10 мин. Затем супернатант аспирировали полностью, а клеточные гранулы повторно суспендировали в 40 мкл буфера на  $10^7$  общего количества клеток. 10 мкл смеси Т-клеточного биотина и антитела Pan (Pan T Cell Biotin-Antibody Cocktail) добавляли на  $10^7$  общего количества клеток, тщательно перемешивали и инкубировали в течение около 5 мин в холодильном аппарате (2-8°C). Затем добавляли 30 мкл

буфера на  $10^7$  общего количества клеток. 20 мкл смеси Т-клеточных микрогранул Pan (Pan T Cell MicroBead Cocktail) добавляли на  $10^7$  клеток. Смесь суспензии клеток хорошо перемешивали и инкубировали в течение еще 10 мин в холодильном аппарате (2-8°C). Для разделения в магнитном поле требуется минимум 500 мкл. Для разделения в магнитном поле колонку LS помещали в магнитное поле подходящего сепаратора MACS. Колонку подготавливали путем промывания 3 мл буфера. Суспензию клеток затем наносили на колонку и собирали фильтрат, содержащий немеченые клетки, которые представляли собой фракции обогащенных Т-клеток. Дополнительные Т-клетки получали путем промывания колонки 3 мл буфера и сбора немеченных клеток, которые попадали в фильтрат. Как и в предыдущем случае, эти немеченные клетки представляли собой обогащенные Т-клетки и были объединены с фильтратом, полученным на предыдущем этапе. Объединенные обогащенные Т-клетки затем центрифугировали и повторно суспендировали в R10 + 100 МЕ/мл IL-2.

Подготовленные Т-клетки затем предварительно активировали в течение 48-96 ч с помощью набора для активации/размножения Т-клеток человека (Miltenyi # 130-091-441) согласно протоколу изготовителя, в котором частицы MACSiBead анти-CD3/CD28 добавляли в соотношении "гранула-клетка" 1:2.

Предварительно активированные Т-клетки трансдуцировали лентивирусным материалом в присутствии 7 мкг/мл полибрана путем центрифугирования при 1200 г, 32°C в течение 1,5 ч. Трансдуцированные клетки затем переносили в инкубатор для клеточной культуры с целью экспрессии трансгена в пригодных условиях.

На день 3 или день 7 после трансдукции трансдуцированные Т-клетки собирали и совместно инкубировали с опухолевыми клетками в течение 20 ч при соотношении эффекторных клеток (CAR-T) и клеток-мишеней 20: 1. Клетками-мишенями были либо линия клеток множественной миеломы человека RPMI8226. Luc, либо линия клеток глиобластомы человека U87MG. Luc, при этом обе линии клеток были сконструированы на собственной базе для экспрессии люциферазы светлячков. Для анализа цитотоксичности CAR-T, направленной на опухолевые клетки, реагенты для анализа люминесценции люциферазы One-glo (Promega # E6110) готовили согласно протоколу производителя и добавляли к совместно культивируемым клеткам для обнаружения остаточной активности люциферазы в лунке. Поскольку люцифераза экспрессируется только в клетках RPMI8226. Luc или U87MG. Luc, то остаточная активность люциферазы в лунке напрямую коррелирует с количеством жизнеспособных клеток-мишеней в лунке. Максимальную активность люциферазы получали путем добавления культуральной среды к клеткам-мишеням в отсутствие эффекторных клеток. Минимальную активность люциферазы определяли добавлением Triton X-100 при конечной концентрации 1% в тот момент, когда начинали исследования цитотоксичности. Специфическую цитотоксичность рассчитывали по формуле

Специфическая цитотоксичность  $\% = 100\% * (1 - (RLU \text{ образца} - RLU_{\text{min}}) / (RLU_{\text{max}} - RLU_{\text{min}}))$ .

Моноспецифические клоны CAR, нацеленные на BCMA (CD269), кодировали, начиная с цифр "269", в то время как моноспецифические клоны CAR, нацеленные на CD38, кодировали аналогично, начиная с цифр "38". Как показано на фиг. 2А, отобранные клоны проявляли различные уровни цитотоксичности на линии клеток множественной миеломы RPMI8226. Luc. более чем с 60% моноспецифических CAR-T на основе  $V_{\text{H}}\text{H}$ , демонстрирующих >50% цитотоксичности, направленной на клетки RPMI8226. Luc. Клоны CAR-T на основе 269A37346, 269A37348, 269A37353, 269A37355, 38A37326, 38A37331, 38A37717 и 38A37719 отбирали для дальнейшего исследования. В частности, клоны CAR-T на основе 269A37346, 269A37348, 269A37353, 269A37355, 38A37326, 38A37331, 38A37717 проявляли сильную цитотоксичность на линию клеток множественной миеломы RPMI8226. Luc более чем с 20-0% повышением уровня гибели клеток RPMI8226. Luc, обусловленной CAR -Т, по сравнению с нетрансдуцированными контрольными Т-клетками (UnT). Тем не менее такое повышение цитотоксичности не наблюдали на линии клеток глиобластомы человека U87MG. Luc (см. фиг. 2В). Не обнаружено никаких достоверных эффектов цитотоксичности, проявляемых моноспецифическими CAR-T-клетками на основе  $V_{\text{H}}\text{H}$ , на клетки U87MG. Luc, по сравнению с контрольными UnT. Наблюдения, описанные выше, продемонстрировали, что некоторые из этих клонов могут быть целенаправленными и имеющими влияние на BCMA- или CD38-положительные клетки.

Пример 3. Получение типовых биспецифических или поливалентных химерных антигенных рецепторов.

Потенциально активные клоны, как описано в Примере 2, также могут быть надлежащими кандидатами для генерации биспецифических или поливалентных CAR на основе  $V_{\text{H}}\text{H}$ . Два репрезентативных клон  $V_{\text{H}}\text{H}$  (анти-BCMA  $V_{\text{H}}\text{H}$  клон 269A37346 и анти-CD38  $V_{\text{H}}\text{H}$  клон 38A37717) были отобраны для построения различных типовых конструкций CAR.

BCMA×CD38 CAR на основе  $V_{\text{H}}\text{H}$  могут быть сгенерированы путем комбинирования  $V_{\text{H}}\text{H}$ , специфических для BCMA, и  $V_{\text{H}}\text{H}$ , специфических для CD38, посредством пригодного пептидного линкера (например, полимера Gly-Ser), с последующей вставкой каркасного вектора сигнального домена CAR. Типовые биспецифические конструкции BCMA×CD38 CAR (GSI5001-GSI5010) приведены в табл. 6. Вначале аминокислотную последовательность анти-BCMA  $V_{\text{H}}\text{H}$  и анти-CD38  $V_{\text{H}}\text{H}$  связывали вместе посредством линкера Gly-Ser, который может иметь разную длину. Затем связанную аминокислотную по-

следовательность помещали после последовательности сигнального пептида CD8. Эту комбинированную последовательность, включающую в себя сигнальный пептид Kozak-CD8 $\alpha$  и биспецифический V<sub>H</sub>H, непосредственно синтезировали и клонировали в каркас PLLV-hEF1 $\alpha$ -81373 CAR посредством участков рестрикции EcoRI and SpeI, согласно общепринятым протоколам молекулярного клонирования, известным в данной области техники. Каркасная последовательность CAR, кодирующая каркасный полипептид CAR, содержит от N-конца до C-конца шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , цитоплазматический домен CD137 и цитоплазматический домен CD3 $\zeta$ , которые химически синтезированы и клонированы в предварительно модифицированный лентивирусный вектор, расположенный по ходу транскрипции, и функционально связаны с конститутивным hEF1 $\alpha$ -промотором. Полученный каркасный вектор CAR был назван "PLLV-hEF1 $\alpha$ -81373".

Кроме того, типовой вектор коэкспрессии, кодирующий BCMA CAR и CD38 CAR, конструировали путем комбинирования CAR на основе V<sub>H</sub>H, специфического для BCMA, и CAR на основе V<sub>H</sub>H, специфического для CD38, в одном векторе CAR с помощью пригодного линкера на основе сплайсинга (T2A, P2A или F2A). Например, конструкция GSI5013 имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 239. Последовательность нуклеиновой кислоты в GSI5013 кодирует от 5' до 3' конца: сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , 38A37717 V<sub>H</sub>H, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий домен CD137, цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$ , T2A, сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , 269A37346 V<sub>H</sub>H, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий домен CD137 и цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

Поливалентные V<sub>H</sub>H CAR можно сконструировать путем введения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей несколько копий одного V<sub>H</sub>H, слитого с каждым другим посредством пептидных линкеров, в каркасный вектор сигнального домена CAR. Типовые поливалентные конструкции CAR (GSI5014, GSI5015, GSI5016, GSI5017) приведены в табл. 5. Эти конструкции получали путем связывания 2-3 копий V<sub>H</sub>H с помощью глицин-серинового линкера с последующим непосредственным синтезированием этой связанной последовательности в комбинации с последовательностью нуклеиновой кислоты сигнального пептида Kozak-CD8 $\alpha$ , и клонированием в каркас PLLV-hEF1 $\alpha$ -81373 CAR посредством участков рестрикции EcoRI и SpeI. В качестве контролей, одну копию V<sub>H</sub>H также клонировали в один и тот же каркас PLLV-hEF1 $\alpha$ -81373 CAR с помощью аналогичных способов (GSI5011 и GSI5012, перечисленные в табл. 4).

Лентивирусные векторы, несущие гены CAR GSI5001-GSI5017, упаковывали и титровали согласно протоколам, как описано в Примере 2. Применяя протоколы, описанные в Примере 2, МКПК человека получали из периферической крови добровольцев для дальнейшего выделения первичных Т-клеток человека с помощью наборов для выделения Т-клеток человека Miltenyi Pan (Miltenyi human Pan T cell isolation kit). Очищенные Т-клетки предварительно активировали и размножали с применением микрогранул анти-CD3/CD28 Miltenyi, как описано в Примере 2. После этого предварительно активированные Т-клетки трансдуцировали лентивирусным материалом в присутствии 7 мкг/мл полибрена путем центрифугирования при 1200 г, 32°C в течение 1,5 ч. Трансдуцированные клетки затем переносили в инкубатор для клеточной культуры с целью экспрессии трансгена в пригодных условиях.

На день 3 после трансдукции трансдуцированные Т-клетки собирали и совместно инкубировали с опухолевыми клетками в течение 20 ч при соотношении эффекторных клеток (CAR-T) и клеток-мишеней 20:1. Для анализа цитотоксичности CAR-T, направленной на опухолевые клетки, реагенты для анализа люминесценции люциферазы One-glo (Promega # E6110) добавляли к совместно культивируемым клеткам и измеряли специфическую цитотоксичность для каждого CAR-T, как описано в Примере 2.

Число копий интегрированных генов CAR для каждой группы определяли с помощью полуколичественного метода ПЦР (кол-ПЦР). Вкратце, геномную ДНК из каждой группы CAR-T получали с помощью набора Gentra Puregene Cell Kit (Qiagen). Концентрацию геномной ДНК определяли с помощью Nanodrop, а образец 10 г геномной ДНК для стандартизированного анализа методом кол-ПЦР обрабатывали SYBR Green Realtime PCR Master mix plus (Toyobo) на устройстве q-PCR ABI # 7300 с применением специфических праймеров CAR (прямой праймер 137P2F (SEQ ID NO: 252): 5'-GTCCTTCTCCTGTCACCTGGTTAT-3'; и обратный праймер 137P2R (SEQ ID NO: 253): 5'-TCTTCTTCTTCTGGAAATCGGCA-3'). Относительное количество копий каждого интегрированного гена CAR вычисляли на основании стандартной кривой, полученной с помощью плазмиды, содержащей целевые последовательности.

В табл. 7 указаны количества копий каждого препарата CAR-T, при этом данные предполагали интеграцию высокоцелевого гена в геном Т-клеток.

Таблица 7

## Количество копий интегрированного генома

CAR конструкциями	Т-клетки с	Копии/ng гДНК
GSI5001		18257060
GSI5002		15105810
GSI5003		17307510
GSI5004		2735165
GSI5005		Не обработано
GSI5006		6692277
GSI5007		6929693
GSI5008		15549250
GSI5009		10602720
GSI5010		7353348
GSI5011		3089537
GSI5012		650551.3
GSS005		1070972
GSI005		321521
UnT		72,77
вода		117

Как проиллюстрировано на фиг. 3А, 3В, моноспецифический V<sub>H</sub>H CAR против BCMA (GSI5011) и моноспецифический V<sub>H</sub>H CAR против CD38 (GSI5012) продемонстрировали сильную цитотоксичность, направленную на линию клеток множественной миеломы RPMI8226. Лус. В случае с GSI5011 CAR лизировались 42,98±2,86% клеток RPMI8226. Лус, а в случае с GSI5012 лизировались 61,25±1,92% клеток RPMI8226. Лус по сравнению с неспецифическим лизисом, обусловленным нетрансдуцированными контрольными Т-клетками (UnT, 9,25±1,11%).

Биспецифические CAR GSI5001-GSI5010 обуславливали мощный специфический лизис линии клеток множественной миеломы RPMI8226. Лус по сравнению с нетрансдуцированными контрольными Т-клетками (UnT). Как иллюстрировано на фиг. 3А и 3В, процент специфического лизиса клеток RPMI8226. Лус составлял 98,91±0,17% для CAR-Т-клеток, экспрессирующих GSI5001, 97,10±0,26% для CAR-Т-клеток, экспрессирующих GSI5002, 93,85±0,69% для CAR-Т-клеток, экспрессирующих GSI5003, 82,81±2,40% для CAR-Т-клеток, экспрессирующих GSI5004, 98,95±0,66% для CAR-Т-клеток, экспрессирующих GSI5005, 93,91±1,25% для CAR-Т-клеток, экспрессирующих GSI5006, 96,49±1,05% для CAR-Т-клеток, экспрессирующих GSI5007, 94,41±0,75% для CAR-Т-клеток, экспрессирующих SI5008, 90,72±0,62% для CAR-Т-клеток, экспрессирующих GSI5009, и 85,05±2,69% для CAR-Т-клеток, экспрессирующих GSI5010, по сравнению с неспецифическим лизисом, обусловленным нетрансдуцированными контрольными Т-клетками (UnT, 9,25±1,11%). Эти результаты также свидетельствовали о том, что более короткий линкер Gly-Ser, по-видимому, демонстрирует более высокую степень цитотоксичности, направленную на опухолевые клетки-мишени. Для изучения таких эффектов в условиях субоптимального анализа можно проводить дополнительные исследования. Более того, порядок анти-BCMA V<sub>H</sub>H и анти-CD38 V<sub>H</sub>H в векторе не оказал существенного влияния на конечную степень цитотоксичности в клетках RPMI8226. Лус. В анализе также готовили две CAR-Т-клетки на основе scFv, в которых GSS005 представлял собой анти-BCMA CAR на основе scFv, а GSI006 представлял собой анти-CD38 CAR на основе scFv. Как GSS005, так и GSI005 продемонстрировали сильный специфический лизис, направленный на клетки RPMI8226. Лус (57,94±1,91% для GSS005; 61,25±1,92% для GSI005).

Были подготовлены сконструированные Т-клетки с моновалентным CAR, специфическим к BCMA (GSI5011), двухвалентным CAR, специфическим к BCMA (GSI5012), или трехвалентным CAR, специфическим к BCMA (GSI5013), и сконструированные Т-клетки с моновалентным CAR, специфическим к CD38 (GSI5012), двухвалентным CAR, специфическим к CD38 (GSI5016) или трехвалентным CAR, специфическим к CD38 (GSI5017), при этом анализы цитотоксичности проводили на клетках RPMI8226. Лус, как описано выше. Как проиллюстрировано на фиг. 4, процент специфического лизиса клеток RPMI8226. Лус составлял 63,25±2,64% для CAR-Т-клеток, экспрессирующих GSI5011, 61,04±2,75% для CAR-Т-клеток, экспрессирующих GSI5014, и 59,57±2,64% для CAR-Т-клеток, экспрессирующих GSI5015, по сравнению с неспецифическим лизисом (0,05±2,33%), обусловленным нетрансдуцированными контрольными Т-клетками (UnT). Так же, как проиллюстрировано на фиг. 4, процент специфиче-

ского лизиса клеток RPMI8226. Лус, обусловленного анти-CD38 V<sub>H</sub>H CAR-T, составлял 95,79±0,62% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5012, 94,16±0,31% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5016, и 97,61±0,77% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5015, по сравнению с неспецифическим лизисом (57,92%±2,88%), обусловленным нетрансдуцированными контрольными Т-клетками (UnT). Приведенные данные свидетельствуют о том, что эти CAR с различными антигенсвязывающими модальностями обладают сильной противоопухолевой активностью, направленной на ВСМА-положительные клетки.

Пример 4. Получение, анализы *in vitro* и *in vivo* типового CD19\*CD20 CAR.

Типовые анти-CD19 sdAb и анти-CD20 sdAb получали с помощью аналогичных процедур, описанных в Примере 1. Эти однодоменные антитела приведены в табл. 2. Моноспецифический CD19 CAR на основе CD19 V<sub>H</sub>H и моноспецифический CD20 CAR на основе CD20 V<sub>H</sub>H получали, как описано в Примере 2, и приведены в табл. 4.

Типовой биспецифический CD19×CD20 CAR на основе CD19 V<sub>H</sub>H и CD20 V<sub>H</sub>H сконструировали, как описано в Примере 3, и приведен в табл. 6. Каркасный вектор CAR, применяемый для построения типового CD19 CAR, CD20 CAR и CD19×CD20 CAR, кодирует от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8α, шарнирный домен CD8α, трансмембранный домен CD28, цитоплазматический домен CD28 и цитоплазматический домен CD3ζ. На фиг. 5 проиллюстрированы конструкции CD19 CAR, CD20 CAR и биспецифического CD19×CD20 CAR. Сконструированные CAR-T-клетки, экспрессирующие CD19 CAR, CD20 CAR или биспецифический CD19×CD20 CAR, получали, как описано в Примере 2.

Цитотоксичность CAR-T-клеток определяли в 4-часовом анализе совместного культивирования. В экспериментах подготовленные CAR-T-клетки центрифугировали, затем разбавляли до желаемых концентраций DPBS с 10% сывороткой АВ человека и культивировали на 96-луночных планшетах. Опухолевые клетки Раджи (Raji), которые, как известно, проявляют сильную экспрессию CD19 и CD20, помечали Calcein-AM (BD Biosciences). Меченые CAR-T-клетки и клетки Раджи культивировали в течение 4 ч при 37°C при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 10:1. Впоследствии цитотоксичность CAR-T-клеток определяли с помощью FACS.

Как проиллюстрировано на фиг. 6, верхняя левая панель, нетрансдуцированные Т-клетки не обуславливали значимого лизиса клеток Раджи. Цитотоксичность в клетках Раджи составляла около 40% и обуславливалась либо CD19- (39%, верхняя правая панель), либо CD20- (41%, нижняя левая панель) моноспецифическими V<sub>H</sub>H CAR-T-клетками. Когда те же самые CD19 V<sub>H</sub>H и CD20 V<sub>H</sub>H соединяли для получения домена, который функционировал в качестве внеклеточного антигенсвязывающего домена в той же конструкции, т.е. в CD19×CD20 биспецифических CAR-T-клетках, цитотоксичность в опухолевых клетках Раджи (75,24%) повышалась по сравнению с моноспецифическими CD19 V<sub>H</sub>H CAR-T или CD20 V<sub>H</sub>H CAR-T-клетками (фиг. 6, нижняя правая панель).

Исследования моделей опухоли мыши.

Мышам линии NOG вводили 4×10<sup>6</sup> клеток Раджи на мышь посредством инъекции в хвостовую вену. Через 10 дней мышей случайным образом разделяли на четыре равные группы, при этом каждой группе вводили эквивалентные дозы нетрансдуцированных Т-клеток, CD19 CAR-T-клеток, CD20 CAR-T-клеток или CD19×CD20 биспецифических CAR-T-клеток соответственно и наблюдали непрерывно в течение 5 недель.

Как проиллюстрировано на фиг. 7, полученные данные выживаемости *in vivo* давали основание предположить, что показатель общей выживаемости для мышей, получавших CD19×CD20 биспецифические CAR, был выше, чем у мышей, получавших CD19- или CD20-моноспецифические CAR-T-клетки.

Пример 5. Получение типовых моноспецифических двухвалентных CAR, имеющих два различных домена, связывающих ВСМА.

Потенциально активные клоны V<sub>H</sub>H, как описано в Примере 2, также можно применять для получения моноспецифических, поливалентных CAR, обладающих двумя или большим количеством различных доменов, связывающихся с мишенью, во внеклеточном антигенсвязывающем домене. Два репрезентативных клон анти-ВСМА sdAb (клон 269A37353 и клон 269A37917) были отобраны для построения различных типовых моноспецифических двухвалентных конструкций CAR, описанных в данном примере.

Двухвалентные CAR, нацеленные на ВСМА (т.е. двухвалентные ВСМА CAR), можно сгенерировать путем слияния двух различных ВСМА-специфических доменов V<sub>H</sub>H посредством пригодного пептидного линкера (например, полимера Gly-Ser), с последующей вставкой слитой конструкции в каркасный вектор сигнального домена CAR. Типовые двухвалентные конструкции ВСМА CAR (GSI5021-GSI5026), имеющие два разных домена 269A37353 и 269A37917, связывающихся с ВСМА, приведены в табл. 5. В различных конструкциях применяли пептидные линкеры различной длины. Каждая из конструкций GSI5021-GSI5023 кодировала от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8α, 269A37353, пептидный линкер, 269A37917, шарнир CD8α, трансмембранный домен CD8α и цитоплазматический домен человека CD3ζ. Каждая из конструкций GSI5024-GSI5026 кодировала от N-конца до C-конца сигнальный пептид CD8α, 269A37917, пептидный линкер, 269A37353, шарнир CD8α, трансмембранный домен

CD8 $\alpha$ , цитоплазматический домен CD137 и цитоплазматический домен человека CD3 $\zeta$ . Каждую конструкцию дополнительно сливали с последовательностью Kozak на 5' конце с целью получения полной кодирующей последовательности. Полную кодирующую последовательность непосредственно синтезировали и клонировали в каркас PLLV-hEF1 $\alpha$ -81373 CAR посредством участков рестрикции EcoRI и SpeI согласно общепринятым протоколам молекулярного клонирования, известным в данной области техники. Напротив, моноспецифические, моновалентные CAR (GSI5019 и GSI5020, перечисленные в табл. 4), имеющие один и тот же каркас сигнального домена CAR, конструировали с помощью аналогичных методов.

Лентивирусные векторы, несущие каждую конструкцию CAR GSI5019-GSI5026, упаковывали и титровали согласно протоколам, как описано в примере 2. Применяя протоколы, описанные в Примере 2, МКПК человека получали из образцов периферической крови добровольцев для дальнейшего выделения первичных Т-клеток человека с помощью наборов для выделения Т-клеток человека Miltenyi Pan (Miltenyi human Pan T cell isolation kit). Очищенные Т-клетки предварительно активировали и размножали с применением микрогранул анти-CD3/CD28 Miltenyi, как описано в Примере 2.

После этого предварительно активированные Т-клетки трансдуцировали лентивирусным материалом в присутствии 7 мкг/мл полибрена путем центрифугирования при 1200 г, 32°C в течение 1,5 ч. Трансдуцированные клетки затем переносили в инкубатор для клеточной культуры с целью экспрессии трансгена в пригодных условиях.

На день 3 после трансдукции трансдуцированные Т-клетки собирали и совместно инкубировали с опухолевыми клетками (клетки RPMI8226. Luc или клетки U87MG. Luc) в течение 20 ч при соотношении эффекторных клеток (CAR-T) и клеток-мишеней 20:1. Клетки RPMI8226. Luc представляют собой клетки множественной миеломы, экспрессирующие люциферазу, и являются BCMA-положительными. Клетки U87MG. Luc представляют собой клетки глиобластомы, экспрессирующие люциферазу, и являются BCMA-отрицательными. Для анализа цитотоксичности CAR-T, направленной на опухолевые клетки, реагенты для анализа люминесценции люциферазы One-glo (Promega # E6110) добавляли к совместно культивируемым клеткам и измеряли специфическую цитотоксичность для каждого CAR-T, как описано в Примере 2.

Как проиллюстрировано на фиг. 8А, процент специфического лизиса клеток RPMI8226. Luc составлял 88,21 $\pm$ 1,29% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5019, 93,84 $\pm$ 1,13% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5020, 71,45 $\pm$ 1,79% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5021, 99,80 $\pm$ 0,45% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5022, 97,46 $\pm$ 0,50% для CAR-T-клеток, экспрессирующих xGSI5023, 81,29 $\pm$ 1,27% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5024, 93,50 $\pm$ 0,47% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5025, 87,83 $\pm$ 0,23% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5026, соответственно, по сравнению с нетрансдуцированными контрольными Т-клетками -13,49 $\pm$ 1,75% (UnT). Также, как проиллюстрировано на фиг. 8В, процент специфического лизиса BCMA-отрицательной линии клеток U87MG Luc составил 2,84 $\pm$ 7,41% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5019, 15,50 $\pm$ 2,24% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5020, 6,74 $\pm$ 3,37% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5021, 8,03 $\pm$ 2,36% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5022, 9,00 $\pm$ 1,88% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5023, 17,03 $\pm$ 2,27% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5024, 16,81 $\pm$ 1,98% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5025, -11,55 $\pm$ 5,43% для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5026, по сравнению с нетрансдуцированными контрольными Т-клетками - 12,49 $\pm$ 3,79% (UnT). Приведенные данные свидетельствуют о том, что поливалентные CAR с различными антигенсвязывающими модальностями обладают сильной противоопухолевой активностью, направленной на BCMA-положительные клетки, но не на BCMA-отрицательные клетки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный рецептор антигенов (CAR), содержащий полипептид, который содержит:

(а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с первым антигеном, и второе однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся со вторым антигеном, где первое и второе sdAb оба представляют собой V<sub>H</sub>H;

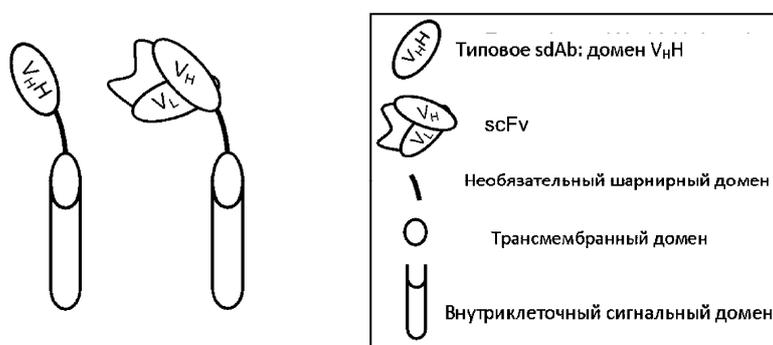
(b) трансмембранный домен; а также

(c) внутриклеточный сигнальный домен,

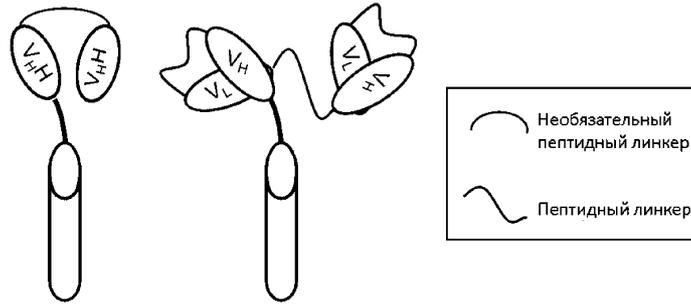
где первое sdAb представляет собой анти-BCMA однодоменное антитело (sdAb), которое содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; и

второе sdAb представляет собой анти-BCMA однодоменное антитело (sdAb), которое содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

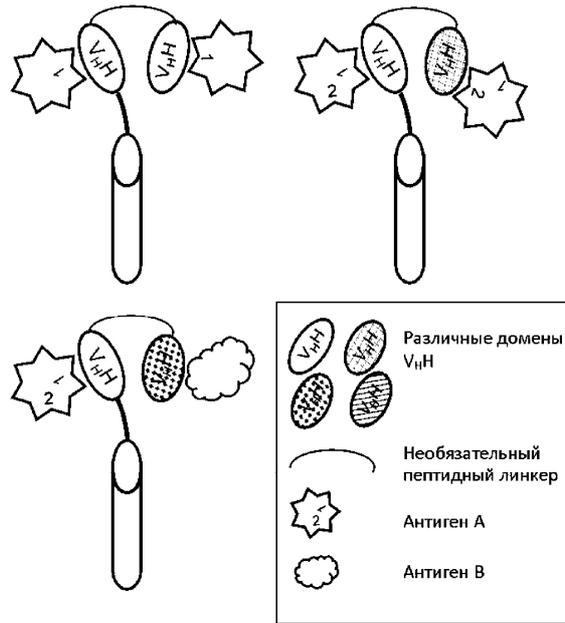
2. CAR по п.1, где первое sdAb расположено на N-конце второго sdAb.
3. CAR по п.1, где первое sdAb расположено на C-конце второго sdAb.
4. CAR по любому из пп.1-3, где первое sdAb и/или второе sdAb является верблюдовым, химерным или гуманизированным.
5. CAR по любому из пп.1-4, где первое sdAb и второе sdAb являются непосредственно слитыми друг с другом с помощью пептидной связи.
6. CAR по любому из пп.1-4, где первое sdAb и второе sdAb являются слитыми друг с другом с помощью пептидного линкера.
7. CAR по п.6, где пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 аминокислот.
8. CAR по любому из пп.1-7, где трансмембранный домен является производным от молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1.
9. CAR по любому из пп.1-8, где внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки.
10. CAR по п.9, где первичный внутриклеточный сигнальный домен является производным от CD3 $\zeta$ .
11. CAR по любому из пп.1-10, где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен.
12. CAR по п.11, где костимулирующий сигнальный домен является производным от костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций.
13. CAR по любому из пп.1-12, дополнительно содержащий шарнирный домен, расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена.
14. CAR по любому из пп.1-13, дополнительно содержащий сигнальный пептид, расположенный на N-конце полипептида, как определено в п.1.
15. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR по любому из пп.1-14.
16. Экспрессионный вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.15.
17. Сконструированная иммунная эффекторная клетка, содержащая CAR по любому из пп.1-14. выделенную нуклеиновую кислоту по п.15 или вектор по п.16.
18. Сконструированная иммунная эффекторная клетка по п.17, где иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку.
19. Фармацевтическая композиция, содержащая сконструированную иммунную эффекторную клетку по п.17 или 18 и фармацевтически приемлемый носитель.
20. Способ лечения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму сконструированной иммунной эффекторной клетки по п.17 или 18 или эффективного количества фармацевтической композиции по п.19.
21. Применение сконструированной иммунной эффекторной клетки по п.17 или 18 или фармацевтической композиции по п.19 для лечения рака у индивидуума.
22. Применение сконструированной иммунной эффекторной клетки по п.17 или 18 или фармацевтической композиции по п.19 для производства лекарственного препарата для лечения рака у индивидуума.
23. Способ по п.20 или применение по п.21 или 22, где рак является множественной миеломой, острым лимфобластным лейкозом или хроническим лимфоцитарным лейкозом.
24. Способ по п.20 или применение по п.21 или 22, где рак является множественной миеломой.



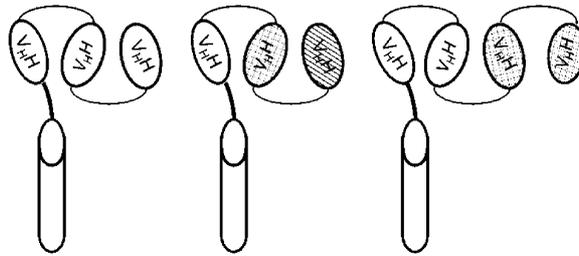
Фиг. 1А



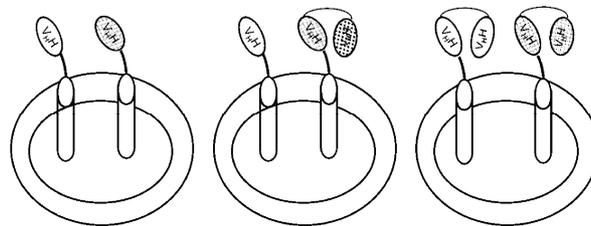
Фиг. 1B



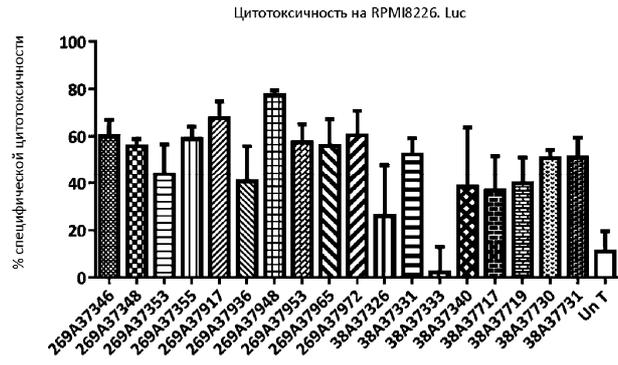
Фиг. 1C



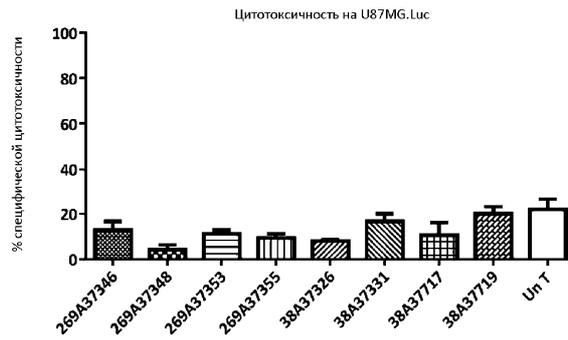
Фиг. 1D



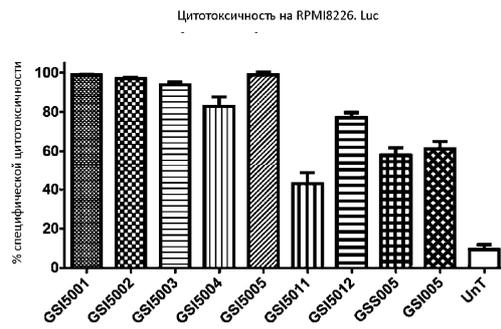
Фиг. 1E



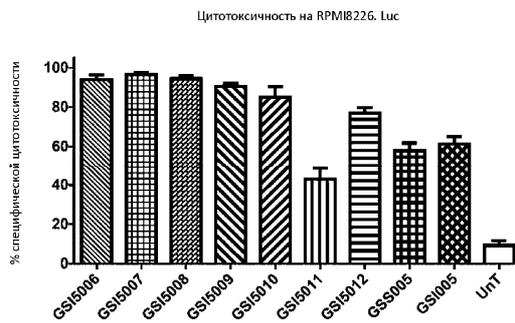
Фиг. 2А



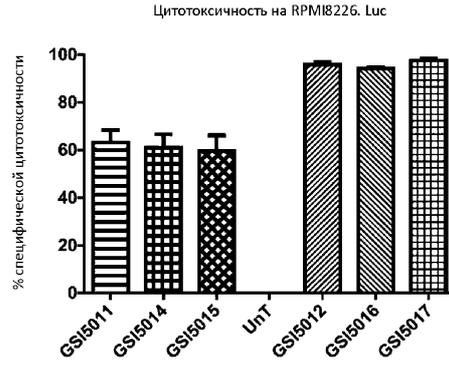
Фиг. 2В



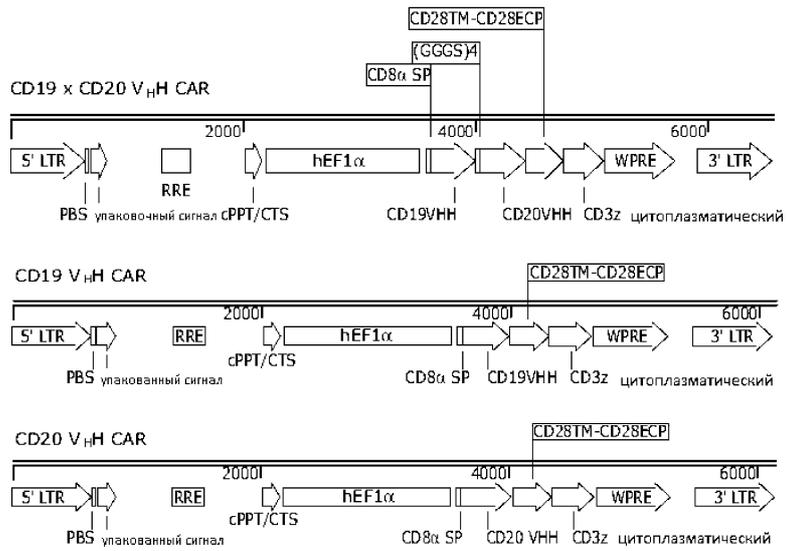
Фиг. 3А



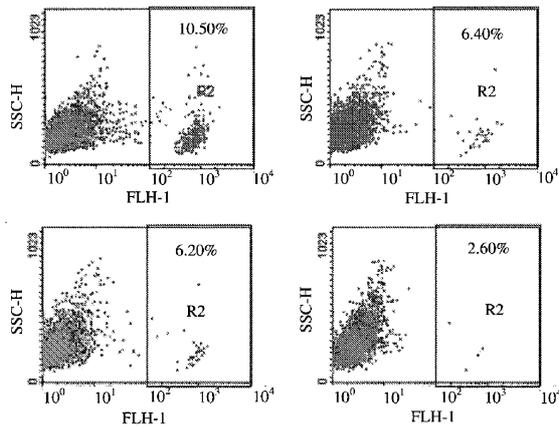
Фиг. 3В



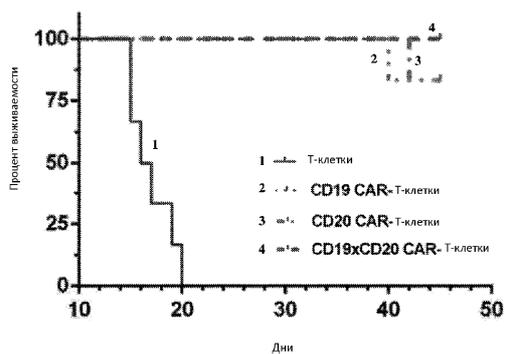
Фиг. 4



Фиг. 5

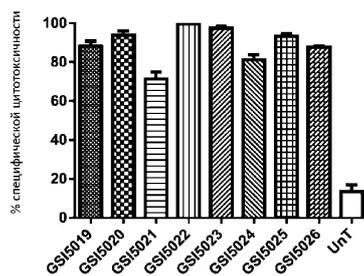


Фиг. 6



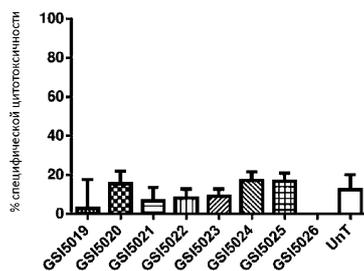
Фиг. 7

Цитотоксичность на RPM18226. Luc



Фиг. 8А

Цитотоксичность на U87MG.Luc



Фиг. 8В

