

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393080** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.01.15

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.03

(54) **ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ СО СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К MAGE-A4 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **63/184,183; 63/239,293**

(72) Изобретатель:
**Брей Кевин, Дельфино Фрэнк,
Дайлилло Дэвид (US)**

(32) **2021.05.04; 2021.08.31**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/027463**

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

(87) **WO 2022/235662 2022.11.10**

(71) Заявитель:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(57) MAGE-A4, или ассоциированный с меланомой антиген A4, представляет собой раково-тестикулярный антиген (СТА) на X-хромосоме. В настоящем изобретении предложены MAGE-A4-специфические химерные антигенные рецепторы, клетки, экспрессирующие такие химерные антигенные рецепторы, и MAGE-A4-специфические выделенные антитела. В некоторых вариантах осуществления полученные генно-инженерными методами клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы настоящего изобретения, способны ингибировать рост опухолей, экспрессирующих MAGE-A4. Полученные генно-инженерными методами клетки настоящего изобретения применимы для лечения заболеваний и расстройств, при которых желателен и/или терапевтически полезен усиленный или индуцированный нацеленный на MAGE-A4 иммунный ответ. Например, полученные генно-инженерными методами клетки, экспрессирующие MAGE-A4-специфические химерные антигенные рецепторы настоящего изобретения, применяются для лечения различных злокачественных новообразований.



A1

202393080

202393080

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579822EA/023

ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ СО СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К MAGE-A4 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании пункта (е) статьи 119 сборника 35 свода законов США по предварительной заявке на патент США №: 63/184,183, поданной 4 мая 2021 г., и 63/239,293, поданной 31 августа 2021 г., каждая из которых для всех целей полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] В настоящую заявку путем ссылки включен перечень последовательностей, представленный в машиночитаемой форме в виде файла 10901WO01-Sequence.txt, созданного 3 мая 2022 г. и содержащего 95 050 байта.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В настоящем описании предложены антитела, химерные антигенные рецепторы (CAR) и полученные генно-инженерными методами клетки, содержащие такие антитела и CAR, которые специфичны в отношении ассоциированного с меланомой антигена A4 (MAGE-A4), и способы их применения.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] MAGE-A4, или ассоциированный с меланомой антиген A4, представляет собой раково-тестикулярный антиген (СТА) на X-хромосоме. Функция MAGE-A4 неизвестна, но он может участвовать в развитии/регуляции клеточного цикла, контроле транскрипции, выживаемости и/или апоптозе клеток. Например, было показано, что сверхэкспрессия MAGE-A4 способствует росту спонтанно трансформированных кератиноцитов полости рта и ингибирует остановку роста клеток в G1.

[0005] MAGE-A4 широко экспрессируется многими опухолями различных гистологических типов, такими как плоскоклеточная карцинома головы и шеи, карцинома легкого, например немелкоклеточная карцинома легкого, плоскоклеточная карцинома пищевода, карцинома ободочной кишки, рак мочевого пузыря, меланомы слизистой оболочки и кожи, карцинома яичников, например серозная карцинома, и карцинома матки, но в нормальных здоровых тканях взрослого человека экспрессия MAGE-A4 ограничена семенниками.

[0006] Способность антигенов MAGE-A4 вызывать иммунные ответы вместе с его ограниченным паттерном экспрессии сделали MAGE-A4 хорошим кандидатом для иммунотерапии злокачественного новообразования.

[0007] Стратегии антител с двойным нацеливанием в приложении к комплексным заболеваниям, таким как злокачественное новообразование, также представляют собой многообещающую стратегию, в которой многофакторная модуляция направлена на повышение терапевтической эффективности. CD3 представляет собой гомодимерный или гетеродимерный антиген, экспрессируемый на Т-клетках в ассоциации с Т-клеточным

рецепторным комплексом (TCR), и необходим для активации Т-клеток. Функциональный CD3 образуется в результате димерной ассоциации двух из четырех различных цепей: эpsilon, дзета, дельта и гамма. Биспецифическое антитело, имеющее плечо связывания MAGE-A4 и плечо связывания CD3, может использоваться для увеличения противоопухолевой активности.

[0008] Адоптивная иммунотерапия, которая включает перенос аутологичных антигенспецифических Т-клеток, полученных *ex vivo*, является другой многообещающей стратегией лечения вирусных инфекций и злокачественного новообразования. Используемые для адоптивной иммунотерапии Т-клетки можно генерировать либо путем наращивания антигенспецифических Т-клеток, либо путем перенаправления Т-клеток методами генной инженерии.

[0009] Новые специфичности у Т-клеток успешно генерировали через генетический перенос трансгенных Т-клеточных рецепторов или химерных антигенных рецепторов (CAR). CAR представляют собой синтетические рецепторы, состоящие из нацеленного фрагмента, который связан с одним или более сигнальными доменами в одной слитой молекуле. Как правило, связывающий фрагмент CAR состоит из антигенсвязывающего домена одноцепочечного антитела (scFv), содержащего переменные фрагменты легкой и тяжелой цепей моноклонального антитела, соединенные гибким линкером. Сигнальные домены для CAR первого поколения получают из цитоплазматической области CD3-дзета или гамма-цепей Fc-рецептора. Было показано, что CAR первого поколения успешно перенаправляют цитотоксичность Т-клеток. Однако они не смогли обеспечить длительное наращивание и противоопухолевую активность *in vivo*. Для получения CAR второго и третьего поколений были добавлены сигнальные домены костимулирующих молекул, а также трансмембранные и шарнирные домены, что привело к некоторым успешным терапевтическим исследованиям с участием людей. Например, CAR-перенаправленные Т-клетки, специфичные для дифференцировочного антигена В-клеток CD19, показали впечатляющую эффективность при лечении В-клеточных злокачественных новообразований, в то время как TCR-перенаправленные Т-клетки продемонстрировали преимущества у пациентов, имеющих солидное злокачественное новообразование. *Stauss et al.* описывают стратегии модификации терапевтических CAR и TCR для применения при лечении злокачественного новообразования, например, для усиления антигенспецифической эффекторной функции и ограничения токсичности полученных генно-инженерными методами Т-клеток (*Current Opinion in Pharmacology* 2015, 24:113-118).

[10] Имеется неудовлетворенная потребность в новых нацеленных агентах на основе стратегий антител с двойным нацеливанием и/или CAR, которые специфически связываются с антигенами MAGE-A4, а также в способах получения и применения таких агентов в терапевтических и диагностических целях.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[11] В одном аспекте в настоящем описании предложен антигенсвязывающий белок,

который специфически связывается с HLA-связанным ассоциированным с меланомой антигеном A4 (MAGE-A4), причем антигенсвязывающий белок содержит переменную область легкой цепи (LCVR) и переменную область тяжелой цепи (HCVR), при этом LCVR содержит определяющие комплементарность области (CDR) LCVR, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 115, и при этом HCVR содержит CDR HCVR, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 107.

[12] В некоторых вариантах осуществления LCVR содержит аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления HCVR содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 107.

[13] В некоторых случаях антигенсвязывающий белок взаимодействует с аминокислотами 286-294 из SEQ ID NO: 32 или их частью.

[14] В одном аспекте в настоящем описании предложен MAGE-A4-специфический химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий от N-конца к C-концу: (a) внеклеточный лиганд-связывающий домен, содержащий домен переменного одноцепочечного фрагмента (scFv) к MAGE-A4, содержащий переменную область легкой цепи (LCVR) и переменную область тяжелой цепи (HCVR); (b) шарнир; (c) трансмембранный домен; и (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен 4-1BB или костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета, причем LCVR содержит определяющие комплементарность области (CDR) LCVR, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 115, и CDR HCVR, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 107.

[15] В некоторых вариантах осуществления MAGE-A4-специфический CAR содержит от N-конца к C-концу: (a) внеклеточный лиганд-связывающий домен; (b) шарнир; (c) трансмембранный домен; и (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен и сигнальный домен. В некоторых случаях домен scFv к MAGE-A4 содержит первый линкер между LCVR и HCVR.

[16] В некоторых вариантах осуществления MAGE-A4-специфический CAR дополнительно содержит второй линкер между внеклеточным лиганд-связывающим доменом и шарниром. В некоторых случаях первый линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 23-26, и второй линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 23-26. В некоторых случаях первый линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 25, а второй линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 23.

[17] В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфического CAR шарнир и/или трансмембранный домен получают из полипептида CD8 α .

[18] В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфического CAR костимулирующий домен содержит костимулирующий домен 4-1BB.

[19] В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфического CAR костимулирующий домен содержит костимулирующий домен CD28.

[20] В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфического CAR шарнир и/или трансмембранный домен получают из полипептида CD28.

[21] В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфического CAR шарнир содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 27.

[22] В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфического CAR трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 28.

[23] В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфического CAR костимулирующий домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 29.

[24] В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфического CAR шарнир содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 34.

[25] В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфического CAR трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 36.

[26] В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфического CAR костимулирующий домен CD28 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 38.

[27] В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфического CAR сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых случаях сигнальный домен CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 30.

[28] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой MAGE-A4-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[29] В некоторых случаях антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе, содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 83. В некоторых случаях HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 4, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 6, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях HCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях HCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 83. В некоторых случаях антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR содержит три CDR

тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 107. В некоторых случаях HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 109, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 111, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 113. В некоторых случаях HCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 107.

[30] В некоторых случаях антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе, содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в LCVR, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 115. В некоторых случаях LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 12, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 14, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях LCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 10. В некоторых случаях LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 117, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 14, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 119. В некоторых случаях LCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 115.

[31] В некоторых случаях антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе, содержит HCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 2, и LCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 10. В некоторых случаях антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе, содержит HCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 83, и LCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 10. В некоторых случаях антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе, содержит HCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 107, и LCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 115.

[32] В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфический CAR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22. В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфический CAR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 105. В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфический CAR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 120. В различных вариантах осуществления MAGE-A4-специфический CAR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 121.

[33] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе, специфически связывается с одной или более аминокислотами в положениях 286-294 последовательности с SEQ ID NO: 32. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе, взаимодействует с одной или более аминокислотами HLA. В некоторых случаях HLA представляет собой HLA-A2.

[34] В одном аспекте в настоящем описании предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 21. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 104.

[35] В одном аспекте в настоящем описании предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, обсуждаемую выше или в настоящем документе. В некоторых случаях вектор представляет собой ДНК-вектор, РНК-вектор, плазмиду, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой лентивирусный вектор.

[36] В одном аспекте в настоящем описании предложена клетка, содержащая молекулу (-ы) нуклеиновой кислоты, обсуждаемую выше или в настоящем документе. В некоторых случаях клетка представляет собой Т-клетку человека.

[37] В одном аспекте в настоящем описании предложена полученная генно-инженерными методами клетка, содержащая антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе. В некоторых случаях полученная генно-инженерными методами клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых случаях иммунная клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых случаях иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-лимфоцит. В некоторых случаях Т-лимфоцит представляет собой воспалительный Т-лимфоцит, цитотоксический Т-лимфоцит, регуляторный Т-лимфоцит или хелперный Т-лимфоцит. В некоторых случаях полученная генно-инженерными методами клетка представляет собой цитотоксический CD8⁺ Т-лимфоцит. В различных вариантах осуществления полученная генно-инженерными методами клетка предназначена для использования при лечении злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4 В некоторых случаях

злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой множественную миелому. В некоторых случаях злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой меланому.

[38] В одном аспекте в настоящем описании предложена полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека, содержащая химерный антигенный рецептор, содержащий от N-конца к С-концу: (а) внеклеточный лиганд-связывающий домен, содержащий домен вариабельного одноцепочечного фрагмента (scFv) к MAGE-A4, содержащий вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR); (b) шарнир; (c) трансмембранный домен; и (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен 4-1BB или костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета, причем LCVR содержит определяющие комплементарность области (CDR) LCVR, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 115, и CDR HCVR, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 107.

[39] В различных вариантах осуществления полученной генно-инженерными методами Т-клетки человека scFv к MAGE-A4 специфически связывается с одним или более аминокислотными остатками в положениях 286-294 последовательности SEQ ID NO: 32. В некоторых случаях домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2/10. В некоторых случаях домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2/83. В некоторых случаях домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 107/115. В некоторых вариантах осуществления HCVR содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и LCVR содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 4, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 6, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 8, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 12, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 14, а LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 16. В некоторых случаях HCVR содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и LCVR содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 109, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 111, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 113, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную

в последовательности с SEQ ID NO: 117, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 14, а LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в последовательности с SEQ ID NO: 119. В некоторых случаях шарнир содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 27. В некоторых случаях трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 28. В некоторых случаях костимулирующий домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых случаях шарнир содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 34. В некоторых случаях трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 36. В некоторых случаях костимулирующий домен CD28 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 38. В некоторых случаях сигнальный домен CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 30.

[40] В различных вариантах осуществления полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22. В различных вариантах осуществления полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 105. В различных вариантах осуществления полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 120. В различных вариантах осуществления полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 121.

[41] В одном аспекте в настоящем описании предложена фармацевтическая композиция, содержащая генетически модифицированную Т-клетку человека и фармацевтически приемлемый носитель, причем генетически модифицированная Т-клетка человека содержит антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит полученную генно-инженерными методами клетку, как обсуждается выше или в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит полученную генно-инженерными методами Т-клетку человека, как обсуждается выше или в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция предназначена для использования при лечении злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4. В некоторых случаях злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой множественную миелому. В некоторых случаях злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой меланому.

[42] В одном аспекте в настоящем описании предложено использование

антигенсвязывающего белка или MAGE-A4-специфического CAR, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора, клетки, полученной генно-инженерными методами клетки или полученной генно-инженерными методами Т-клетки человека, как обсуждается выше или в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4. В некоторых случаях злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой множественную миелому. В некоторых случаях злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой меланому.

[43] В одном аспекте в настоящем описании предложен способ повышения активности Т-лимфоцитов у субъекта, включающий введение субъекту Т-лимфоцита, содержащего антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе.

[44] В одном аспекте настоящее описание обеспечивает способ лечения субъекта, имеющего злокачественное новообразование, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества Т-лимфоцита, содержащего антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе.

[45] В одном аспекте в настоящем описании предложен способ стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа на целевую популяцию клеток или ткань у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии антигенсвязывающего белка или MAGE-A4-специфического CAR, обсуждаемого выше или в настоящем документе.

[46] В одном аспекте в настоящем описании предложен способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии антигенсвязывающего белка или MAGE-A4-специфического CAR, обсуждаемого выше или в настоящем документе.

[47] В любом из различных способов, обсуждаемых выше или в настоящем документе, субъект может представлять собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет множественную миелому, синовиальную саркому, рак пищевода, рак головы и шеи, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак матки, рак желудка, рак шейки матки, рак молочной железы или меланому. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет множественную миелому.

[48] В одном аспекте в настоящем описании предложен способ конструирования популяции клеток для экспрессии антигенсвязывающего белка или MAGE-A4-специфического CAR, обсуждаемого выше или в настоящем документе, включающий: (a) введение в популяцию иммунных клеток молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе; (b) культивирование популяции иммунных клеток в условиях для экспрессии указанных молекул нуклеиновой кислоты; и (c) выделение иммунных клеток,

экспрессирующих указанный MAGE-A4-специфический антигенсвязывающий белок на клеточной поверхности. В некоторых случаях способ дополнительно включает получение популяции иммунных клеток от субъекта перед введением молекулы нуклеиновой кислоты.

[49] В одном аспекте в настоящем описании предложен способ лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4, у субъекта, включающий: (a) получение с помощью генно-инженерных методов популяции клеток, как обсуждается выше или в настоящем документе; и (b) обратное введение популяции клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор, субъекту. В некоторых случаях злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой множественную миелому.

[50] В одном аспекте в настоящем описании предложен выделенный антигенсвязывающий белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с HLA-связанным ассоциированным с меланомой антигеном A4 (MAGE-A4), и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, при этом первый антигенсвязывающий домен содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (A1-HCVR), и три CDR легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (A1-LCVR), а второй антигенсвязывающий домен содержит три CDR тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (A2-HCVR), и три CDR легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (A2-LCVR), причем A1-HCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, A1-LCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10, A2-HCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 55 и A2-LCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10.

[51] В одном аспекте в настоящем описании предложен выделенный антигенсвязывающий белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с HLA-связанным ассоциированным с меланомой антигеном A4 (MAGE-A4), и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, при этом первый антигенсвязывающий домен содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (A1-HCVR), и три CDR легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (A1-LCVR), а второй антигенсвязывающий домен содержит три CDR тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (A2-HCVR), и три CDR легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (A2-LCVR), причем A1-HCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, A1-LCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10, A2-HCVR содержит

аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 73 и A2-LCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10.

[52] В различных вариантах осуществления выделенного антигенсвязывающего белка, обсуждаемого выше или в настоящем документе, антигенсвязывающий белок взаимодействует с аминокислотами 286-294 из SEQ ID NO: 32 или их частью. В некоторых случаях выделенный антигенсвязывающий белок представляет собой CAR. В некоторых случаях выделенный антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления выделенный антигенсвязывающий белок взаимодействует с CD3. В некоторых случаях выделенный антигенсвязывающий белок содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 83. В некоторых случаях выделенный антигенсвязывающий белок содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 55. В некоторых случаях выделенный антигенсвязывающий белок содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 73.

[53] В одном аспекте в настоящем описании предложен выделенный антигенсвязывающий белок, который связывается с тем же эпитопом, что и антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR, обсуждаемый выше или в настоящем документе. В одном аспекте в настоящем описании предложен выделенный антигенсвязывающий белок, который конкурирует за связывание с антигенсвязывающим белком или MAGE-A4-специфическим CAR, обсуждаемым выше или в настоящем документе. В некоторых случаях выделенный антигенсвязывающий белок представляет собой CAR. В некоторых случаях выделенный антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифическое антитело. В некоторых случаях выделенный антигенсвязывающий белок взаимодействует с аминокислотами 286-294 из SEQ ID NO: 32 или их частью. В некоторых случаях выделенный антигенсвязывающий белок взаимодействует с CD3. В некоторых вариантах осуществления выделенный антигенсвязывающий белок содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую три CDR тяжелой цепи, HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4, 6 и 8 соответственно. В некоторых вариантах осуществления выделенный антигенсвязывающий белок содержит HCVR, соответствующую другому плечу биспецифического антитела, содержащую три CDR тяжелой цепи, HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 57, 59 и 61 соответственно. В некоторых вариантах осуществления выделенный антигенсвязывающий белок содержит HCVR, соответствующую другому плечу биспецифического антитела, содержащую три CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 75, 77 и 79 соответственно. В некоторых случаях выделенный

антигенсвязывающий белок содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 10, и/или LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 63.

[54] В одном аспекте в настоящем описании предложено выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с полипептидом ассоциированного с меланомой антигена A4 (MAGE-A4), причем антитело обладает одной или более из следующих характеристик: (а) связывается с полипептидом MAGE-A4 с EC50 менее примерно 2×10^{-9} M; (b) проявляет способность снижать жизнеспособность опухолевых клеток по сравнению с выделенными рекомбинантными антителами, которые не связываются специфически с полипептидом MAGE-A4; и/или (с) содержит (i) три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, на по меньшей мере примерно 90% идентичную последовательности HCVR, указанной в таблице 1; и (ii) три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, на по меньшей мере примерно 90% идентичную последовательности LCVR, указанной в таблице 1.

[55] В некоторых вариантах осуществления выделенного рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с полипептидом MAGE-A4, полипептид MAGE-A4 представляет собой связанный с HLA-A2 полипептид MAGE-A4. В некоторых случаях выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 107. В некоторых случаях выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 115. В некоторых случаях выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2/10, или SEQ ID NO: 83/10, или SEQ ID NO: 107/115.

[56] В одном аспекте в настоящем описании предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее: (а) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4; (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6; (с) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8; (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12; (е) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14; и (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16.

[57] В одном аспекте в настоящем описании предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее: (а) домен HCDR1, имеющий

аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 109; (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 111; (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 113; (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 117; (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14; и (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 119.

[58] В различных вариантах осуществления выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обсуждаемого выше или в настоящем документе, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG1 или антитело IgG4. В некоторых случаях осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело.

[59] В одном аспекте в настоящем описании предложено выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с полипептидом ассоциированного с меланомой антигена A4 (MAGE-A4), и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с полипептидом CD3, причем: (a) первый антигенсвязывающий домен (A1), который связывается с MAGE-A4, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), причем: A1-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 109; A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 111; A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 113; A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 117; A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14; A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 119; и (b) второй антигенсвязывающий домен (A2), который связывается с CD3, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3), причем: A2-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 75; A2-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 77; A2-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 61 или SEQ ID NO: 79; A2-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 117; A2-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14; A2-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 119.

[60] В одном аспекте настоящее описание обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как обсуждалось выше или в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый

носитель или разбавитель. В некоторых случаях осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит второй терапевтический агент. В некоторых случаях второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из противоопухолевого агента, стероидов и средств таргетной терапии.

[61] В одном аспекте в настоящем описании предложена молекула полинуклеотида, содержащая последовательность полинуклеотида, которая кодирует одну или более HCVR и/или одну или более LCVR антитела, как обсуждается выше или в настоящем документе, и вектор, содержащий полинуклеотид, и клетка, содержащая вектор.

[62] В одном аспекте в настоящем описании предложен способ лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4, включающий введение субъекту антитела или антигенсвязывающего фрагмента, как обсуждается выше или в настоящем документе, или фармацевтической композиции, как обсуждается выше или в настоящем документе. В некоторых случаях фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом. В некоторых случаях второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из противоопухолевого агента, стероидов и средств таргетной терапии.

[63] Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора следующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[64] На **ФИГ. 1** показан иллюстративный нуклеотидный конструктор для экспрессии конструктора химерного антигенного рецептора (CAR). Иллюстративный нуклеотидный конструктор включает scFv VL-линкер-VH к MAGE-A4, шарнир и трансмембранный домен CD8 человека, костимулирующий домен 4-1BB, сигнальный домен CD3-дзета и необязательно последовательность IRES:eGFP для отслеживания CAR трансдуцированных клеток.

[65] На **ФИГ. 2** показано иллюстративное биспецифическое антитело настоящего описания. Иллюстративное биспецифическое антитело состоит из одной HCVR, способной взаимодействовать с MAGE-A4 (плечо к MAGE-A4), и другой HCVR, способной взаимодействовать с CD3 (плечо к CD3). В представительном примере LCVR являются общими (например, обе соответствуют антителу к CD3 или легкой цепи антитела, о которой известно, что она неизбирательно или эффективно соединяется с множеством плеч тяжелой цепи).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[66] Следует понимать, что описанные в настоящем документе изобретения не ограничиваются конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, и, соответственно, способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не является ограничивающей, так как объем настоящих изобретений ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты осуществления или признаки вариантов осуществления могут быть объединены

друг с другом, и такие комбинации явно входят в объем настоящего изобретения. Любое конкретное значение, описанное выше или в настоящем документе, можно комбинировать с другим связанным значением, описанным выше или в настоящем документе, для приведения диапазона, в котором указанные значения представляют собой верхний и нижний пределы диапазона, и такие диапазоны находятся в пределах объема настоящего описания.

[67] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которым относятся изобретения. Используемый в настоящем документе термин «примерно» при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что фактическое значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, в контексте настоящего документа выражение «примерно 100» включает 99 и 101, и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.).

[68] В настоящем документе также описаны предпочтительные способы и материалы, хотя для практического осуществления или проверки настоящих изобретений могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в настоящем описании, полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Определения

[69] Используемый в настоящем документе термин «MAGE-A4» относится к ассоциированному с меланомой антигену A4. MAGE-A4 представляет собой внутриклеточный белок, экспрессируемый множеством различных опухолевых клеток. Используемый в настоящем документе термин «MAGE-A4» относится к белку MAGE-A4 человека, если не указано, что он принадлежит к отличным от человека видам (например, «MAGE-A4 мыши», «MAGE-A4 обезьяны» и т. д.). Белок MAGE-A4 человека имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32, и последовательность полинуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 31. Ссылки на конкретные области полипептида MAGE-A4 (например, MAGE-A4 286-294) относятся к SEQ ID NO: 32. Используемые в настоящем документе термины «MAGE-A4 286-294», «MAGE-A4 (286-294)» и «MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄» могут использоваться взаимозаменяемо. Полипептидная последовательность MAGE-A4 (286-294) (KVLEHVVRV) представлена как SEQ ID NO: 33.

[70] Используемый в настоящем документе термин «антитело, связывающее MAGE-A4» или «антитело к MAGE-A4» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают по меньшей мере MAGE-A4. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывает MAGE-A4, взаимодействует с аминокислотами 286-294 MAGE-A4. Описываемое в настоящем документе «антитело, связывающее MAGE-A4» или «антитело к MAGE-A4» может дополнительно быть способно специфически распознавать и другие родственные MAGE-A4 пептиды (например, родственные MAGE-A4 пептиды, для которых предсказано образование

комплексов с HLA-A2). Кроме того, антитело, связывающее MAGE-A4, может дополнительно быть способно связывать один или более дополнительных лигандов, например, при его подготовке в формате биспецифического антитела. В отдельных вариантах осуществления антитело к MAGE-A4 может быть сформировано как биспецифическое антитело, которое связывает и MAGE-A4 и CD3.

[71] Термины «лиганд-связывающий домен» и «антигенсвязывающий домен» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к той части химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела, которое специфически связывается с заранее определенным антигеном (например, MAGE-A4). Ссылки на «соответствующее антитело» относятся к антителу, из которого получены CDR или переменные области (переменная область тяжелой цепи (сокращенно HCVR или VH) и переменная область легкой цепи (сокращенно LCVR или VL)), используемые в химерном антигенном рецепторе или биспецифическом антителе. Например, конструкторы химерного антигенного рецептора, обсуждаемые в примерах, включают scFv с переменными областями, полученными из антитела к MAGE-A4. Это антитело к MAGE-A4 является «соответствующим антителом» в отношении соответствующего химерного антигенного рецептора.

[72] Используемый в настоящем документе термин «антитело» означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR), который специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, MAGE-A4). В некоторых вариантах осуществления антитело может связываться или взаимодействовать с MHC-связанным полипептидом, таким как HLA-связанный полипептид. В контексте настоящего описания, в некоторых вариантах осуществления антитело может связываться с HLA-A2-связанным полипептидом, таким как полипептид MAGE-A4 (например, MAGE-A4 286-294), представленный HLA-A2. Термин «антитело» включает «биспецифическое антитело», включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи - две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи - соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM); однако молекулы иммуноглобулина, состоящие только из тяжелых цепей (т. е. не содержащие легкие цепи), также охватываются определением термина «антитело». Термин «антитело» также включает молекулы иммуноглобулина, состоящие из четырех полипептидных цепей - двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей - соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь (сокращенно обозначаемая в настоящем документе как HC) содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Каждая легкая цепь (сокращенно обозначаемая в настоящем документе как LC) содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}).

Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления настоящего описания, FR антитела к MAGE-A4 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть природно или искусственно модифицированы. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе сравнительного анализа двух или более CDR.

[73] Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения антитела представляют собой биспецифические антитела. Например, в отдельных вариантах осуществления антитело к MAGE-A4 (например, mAbM31339N2) переформатируется в биспецифические антитела (например, антитела к MAGE-A4 CD3) с использованием либо плеча к CD3 с высокой аффинностью (7195P) для получения bsb6054, либо плеча к CD3 со средней аффинностью (7221G) для получения bsAb6043.

[74] Термин «антитело» при использовании в настоящем документе также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п. в контексте настоящего документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или полученный генно-инженерными методами полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с MAGE-A4 (или родственным MAGE-A4 пептидом) и/или CD3. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генной инженерии, включающие обработку и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антител. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с помощью методик молекулярной биологии, например, для размещения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д.

[75] Не имеющие ограничительного характера примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii)

минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3) или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие полученные генно-инженерными методами молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т. д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также охватываются выражением «антигенсвязывающий фрагмент», в контексте настоящего документа.

[76] Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая прилегает к одной или более каркасным последовательностям или находится в рамке считывания с ними. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , ассоциированный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены друг относительно друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и может содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

[77] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Не имеющие ограничительного характера примеры конфигураций переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела настоящего описания, включают: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе в любой из примерных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть или непосредственно связаны друг с другом или могут быть связаны полной или неполной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему описанию может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним либо более мономерными V_H - или V_L -доменами (например, с помощью дисульфидной (-ых) связи (-ей)).

[78] В некоторых вариантах осуществления антитела к MAGE-A4, из которых получены антигенсвязывающие фрагменты, являются антителами человека. Термин

«антитело человека», в контексте данного документа, предполагает включение в себя антител, имеющих переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека настоящего описания могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин «антитело человека», используемый в настоящем документе, не предполагает включение антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были встроены в каркасные последовательности человека.

[79] В различных вариантах осуществления биспецифические антитела к MAGE-A4 × CD3 (например, bsAb 6054 и/или bsAb 6043) настоящего описания представляют собой антитела человека. В различных вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 представляет собой антитело IgG человека. В различных вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 представляет собой антитело человека изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, или смешанного изотипа. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 представляет собой антитело IgG1 человека (т. е. антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1 человека, присоединенную, соответственно, к HCVR каждого из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена). В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 представляет собой антитело IgG4 человека (т. е. антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG4 человека, присоединенную, соответственно, к HCVR каждого из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена). В любом из вариантов осуществления, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 может содержать легкую каппа-цепь человека. В любом из вариантов осуществления, обсуждаемых выше или в настоящем документе, биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 может содержать легкую лямбда-цепь человека.

[80] В любых вариантах осуществления биспецифическое антитело может включать модификацию одной или обеих тяжелых цепей для облегчения очистки биспецифического антитела (т. е. гетеродимера) от гомодимерных примесей. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела включают первую и вторую тяжелые цепи (т. е. тяжелую цепь MAGE-A4-связывающего плеча и тяжелую цепь CD3-связывающего плеча), которые являются идентичными (например, обе относятся к изотипу IgG1 или IgG4), за исключением модификации в домене CH3 одной или другой тяжелой цепи, снижающей связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с антителом без указанной модификации. В некоторых случаях домен CH3 первой тяжелой цепи (например, MAGE-A4-связывающего плеча) связывает белок А, а домен CH3 второй тяжелой цепи

(например, CD3-связывающего плеча) содержит мутацию, снижающую или устраняющую связывание белка А. В некоторых случаях мутация представляет собой модификацию H435R (по нумерации EU; H95R по нумерации экзонов IMGT). В некоторых случаях мутация представляет собой модификацию H435R (по нумерации EU; H95R по нумерации экзонов IMGT) и модификацию Y436F (по нумерации EU; Y96F по IMGT). Дополнительные модификации, которые можно найти во втором CH3 домене, включают: D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU (D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I по IMGT) в случае CH3 доменов IgG1; и Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU (Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I по IMGT) в случае CH3 доменов IgG4.

[81] В любых вариантах осуществления биспецифическое антитело может включать химерный шарнир. Подразумевается, что термин «химерный шарнир» включает химерный белок, содержащий первую аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области одной молекулы Ig, и вторую аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области другого класса или подкласса молекулы Ig. Например, химерный шарнир содержит, в одном варианте осуществления, первую аминокислотную последовательность или «верхнюю шарнирную» последовательность, полученную из шарнирной области IgG1 человека или шарнирной области IgG4 человека, и вторую аминокислотную последовательность или «нижнюю шарнирную» последовательность, полученную из шарнирной области IgG2 человека. В отдельных вариантах осуществления первая или «верхняя шарнирная» последовательность содержит аминокислотные остатки в положениях с 216 по 227 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления вторая или «нижняя шарнирная» последовательность содержит аминокислотные остатки в положениях с 228 по 236 в соответствии с нумерацией EU.

[82] Антитела настоящего описания, которые включают биспецифические антитела, антитела, используемые для получения антигенсвязывающих фрагментов к MAGE-A4, и/или химерные антигенные рецепторы могут в некоторых вариантах осуществления представлять собой рекомбинантные антитела человека. В контексте настоящего документа термин «рекомбинантное антитело человека» предназначен для включения всех антител человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, например, антител, экспрессируемых с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описано дополнительно ниже), антител, выделенных из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека (описано дополнительно ниже), антител, выделенных из организма животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al., 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг генных последовательностей иммуноглобулина человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина

зародышевой линии человека. Тем не менее в отдельных вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, в случае использования трансгенного животного, имеющего последовательности Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и родственны им, не могут в природе существовать в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

[83] Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с различиями шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильный четырехцепочечный конструктор массой приблизительно 150-160 кДа, в котором димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, и образуется молекула массой приблизительно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Эти формы чрезвычайно трудно разделить даже после аффинной очистки.

[84] Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена, без ограничений, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области шарнира человеческого IgG4 может значительно уменьшить частоту появления второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнира человеческого IgG1. Настоящее описание охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнирном, C_{H2} или C_{H3} участке, которые могут быть желательны, например, при производстве, для улучшения выхода желаемой формы антитела.

[85] Описываемые в настоящем документе антитела, что включает биспецифические антитела, могут представлять собой выделенные антитела. Термин «выделенное антитело», используемый в настоящем документе, означает антитело, которое было определено и отделено и/или извлечено по меньшей мере из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которой антитело существует в природе или продуцируется естественным путем, является «выделенным антителом» для целей настоящего описания. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Таким образом, выделенное антитело также включает антител, которое по существу не содержит других антител, имеющих специфичность к другим антигенам (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с MAGE-A4 человека, или с MAGE-A4 человека и CD3 человека, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от MAGE-A4 человека, или от MAGE-A4 человека и CD3

человека). Однако, как описывается в настоящем документе, выделенное антитело, такое как антитело, которое специфически связывается с MAGE-A4 человека, может в некоторых примерах дополнительно специфически связываться с одним или более другими родственными MAGE-A4 белками или пептидами. В соответствии с определенными вариантами осуществления выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

[86] Термин «специфически связывает» и т. п. означает, что антитело (что включает биспецифическое антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно устойчивым в физиологических условиях. Специфичное связывание может быть охарактеризовано константой диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно 1×10^{-6} М или более. Способы определения того, являются ли две молекулы специфически связывающимися, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. Выделенное антитело, которое специфически связывается с MAGE-A4 человека либо с MAGE-A4 человека и CD3 человека, может, тем не менее, обладать перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы MAGE-A4 и/или CD3 от других видов (ортологи). В контексте настоящего изобретения считается, что моноспецифические антитела, которые связываются с MAGE-A4 человека, а также с одним или более дополнительными антигенами, включая родственные MAGE-A4 пептиды, «специфически связывают» MAGE-A4 человека. В контексте настоящего изобретения считается, что мультиспецифические (например, биспецифические) антитела, которые связываются с MAGE-A4 человека и CD3 человека, а также одним или более дополнительных антигенов, «специфически связывают» MAGE-A4 человека и CD3 человека.

[87] Биспецифические антитела, содержащие MAGE-A4-специфический связывающий домен и CD3-специфический связывающий домен, могут быть сконструированы с использованием стандартных методик, причем каждый из антигенсвязывающего домена к MAGE-A4 и антигенсвязывающего домена к CD3 содержит разные, отдельные HCVR в паре с общей LCVR. В приведенных в качестве примеров биспецифических антитела молекулы были сконструированы с использованием тяжелой цепи из антитела к CD3, тяжелой цепи из антитела к MAGE-A4 и общей легкой цепи из антитела к MAGE-A4. В других случаях биспецифические антитела могут быть сконструированы с использованием тяжелой цепи из антитела к CD3, тяжелой цепи из антитела к MAGE-A4 и легкой цепи из антитела к CD3 или легкой цепи антитела, о которой известно, что она неизбирательно или эффективно соединяется с множеством плеч тяжелой цепи.

[88] В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело к MAGE-A4 \times CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с MAGE-A4 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который

специфически связывается с CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3 соответственно, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4, 6 и 8, а второй антигенсвязывающий домен содержит CDR тяжелой цепи A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3 соответственно, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 57 или 75, 59 или 77 и 61 или 79 соответственно. Согласно отдельным вариантам осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит общие (для первого и второго антигенсвязывающих доменов) определяющие комплементарность области легкой цепи LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответственно. В одном примере общие определяющие комплементарность области легкой цепи содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 12, 14 и 16. В других примерах общие определяющие комплементарность области легкой цепи содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 65, 14 и 67.

[89] В отдельных вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает MAGE-A4 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 107, а второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 73. В отдельных вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит общую переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 115. В отдельных вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2/10, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 55/10 или содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 73/10. В отдельных вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 83/10, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 55/10 или содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 73/10. В отдельных вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 107/115, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 55/115 или содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 73/115. В отдельных вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2/63, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 55/63 или содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 73/63. В отдельных вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 83/63, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 55/63 или содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 73/63. В отдельных вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 107/63, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 55/63 или содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 73/63. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 содержит пары последовательностей HCVR/LCVR, указанные выше, и константную область тяжелой цепи IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 содержит пары последовательностей HCVR/LCVR, указанные выше, и константную область тяжелой цепи IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 содержит пары последовательностей HCVR/LCVR, указанные выше, и константную область тяжелой цепи IgG человека. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 содержит пары последовательностей HCVR/LCVR, указанные выше, и константную область тяжелой цепи IgG1 или IgG4 человека.

[90] Описанные в настоящем документе антитела к MAGE-A4 или их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов

тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее описание включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, при этом одна или более аминокислот в одной или более каркасных областей и/или областей CDR мутированы до соответствующего (-их) остатка (остатков) последовательности зародышевой линии, из которой антитело происходило, или до соответствующего (-их) остатка (остатков) другой последовательности зародышевой линии человека или до консервативной аминокислотной замены соответствующего (-их) остатка (остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в настоящем документе совместно как «мутации зародышевой линии»). Специалист в данной области техники, начиная с раскрытых в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, содержащих одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах V_H и/или V_L мутированы обратно в остатки, содержащиеся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было первоначально получено антитело. В других вариантах осуществления только некоторые остатки мутированы обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например только мутированные остатки, содержащиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, содержащиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько каркасных остатков и/или остатков CDR мутируют до соответствующего остатка (остатков) другой последовательности зародышевой линии (т. е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело изначально происходило). Кроме того, антитела по настоящему описанию могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных областях и/или областях CDR, например, при этом определенные отдельные остатки мутируют до соответствующего остатка определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или мутируют до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко исследованы в отношении одного или более требуемых свойств, таких как повышенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или повышенные антагонистические либо агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств),

ослабленная иммуногенность и т. п. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные с помощью этого общего подхода, включены в настоящее описание.

[91] Антитела к MAGE-A4 могут содержать варианты любой из описанных в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или более консервативных замен. Например, антитела к MAGE-A4 могут иметь аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, 10 или меньше, 9 или меньше, 8 или меньше, 7 или меньше, 6 или меньше, 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше, или 1 консервативных аминокислотных замен относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, указанных в настоящем документе.

[92] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с определенным антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными областями на антигене и могут оказывать разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован сближенными в пространстве аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образованный смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах, эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

[93] Термин «по существу идентичность» или «по существу идентичный» применительно к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту означает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) имеет место идентичность нуклеотидных оснований нуклеотидной последовательности, составляющая по меньшей мере примерно 95% и более предпочтительно по меньшей мере примерно 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9%, при измерении с помощью любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, по существу идентичная референсной молекуле нуклеиновой кислоты, в определенных случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый указанной референсной молекулой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложен полипептид, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%,

по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 105, или части последовательности с SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 105 (например, HCVR, такой как последовательность с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 83, или LCVR, такой как последовательность с SEQ ID NO: 10, или каркасной области полипептидной последовательности, например, таких, которые присутствуют в последовательностях с SEQ ID NO: 2, 10, 22 или 105). В некоторых вариантах осуществления настоящее описание обеспечивает полинуклеиновую кислоту, кодирующую такой полипептид. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложена полинуклеиновая кислота, содержащая последовательность, которая на по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или на 100% идентична последовательности с SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 104, или части последовательности с SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 104 (например, HCVR, такой как последовательность с SEQ ID NO: 1, или LCVR, такой как последовательность с SEQ ID NO: 9, или каркасной области полипептидной последовательности, например, таких, которые присутствуют в последовательностях с SEQ ID NO: 1, 9, 21 или 104).

[94] В некоторых вариантах осуществления настоящее описание обеспечивает полипептид, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 69 или ее части, такой как последовательность SEQ ID NO: 55; либо последовательности SEQ ID NO: 71 или ее части, такой как последовательность SEQ ID NO: 63; либо последовательности SEQ ID NO: 81 или ее части, такой как последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления настоящее описание обеспечивает полинуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере

мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 68 или ее части, такой как последовательность SEQ ID NO: 54; либо последовательности SEQ ID NO: 70 или ее части, такой как последовательность SEQ ID NO: 62; либо последовательности SEQ ID NO: 80 или ее части, такой как последовательность SEQ ID NO: 72.

[95] Применительно к полипептидам термин «по существу сходство» или «по существу схожий» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, обладают идентичностью последовательностей по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно обладают идентичностью последовательностей по меньшей мере 98% или 99%. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с подобными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена по существу не изменит функциональных свойств белка. В тех случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности или степень сходства последовательностей могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы внести поправку на консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в настоящий документ путем ссылки. Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидосодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице

логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в публикации Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445, которая включена в настоящий документ путем ссылки. «Умеренно консервативной» заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[96] Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков подбирает сходные последовательности, применяя меры сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы как Gap и Bestfit, которые могут быть использованы с параметрами по умолчанию для определения гомологии или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать, используя FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательности областей наилучшего перекрытия между запросом и последовательностями поиска (Pearson (2000) выше). Последовательности также можно сравнивать с использованием алгоритма поиска гомологии Смита - Уотермана, используя аффинный поиск гэпов со штрафом за открытие гэпа 12 и штрафом за продление гэпа 2, матрицу BLOSUM 62. Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему описанию с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215 403-410 и Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, каждая из которых включена в настоящий документ путем ссылки.

[97] В контексте настоящего изобретения термины «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» относятся к нуклеотидам и/или полинуклеотидам, таким как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) или рибонуклеиновая кислота (РНК), олигонуклеотидам, фрагментам, полученным в результате полимеразной цепной реакции (ПЦР), и фрагменты, образованные в результате лигирования, расщепления, эндонуклеазного или экзонуклеазного действия. Молекулы нуклеиновых кислот могут состоять из мономеров, которые представляют собой встречающиеся в природе нуклеотиды (такие как ДНК и РНК), или аналоги встречающихся в природе нуклеотидов (например, энантиомерные формы встречающихся в природе нуклеотидов), или их комбинации. Модифицированные нуклеотиды могут иметь изменения в сахарных фрагментах и/или фрагментах пиримидиновых или пуриновых оснований. Модификации сахаров включают, например, замену одной или более гидроксильных групп галогенами, алкильными

группами, аминами и азидогруппами, или сахара могут быть функционализированы как простые или сложные эфиры. Кроме того, весь сахарный фрагмент может быть замещен стерически и электронно подобными структурами, такими как аза-сахара и карбоциклические аналоги сахаров. Примеры модификаций в фрагменте основания включают алкилированные пурины и пиримидины, ацилированные пурины или пиримидины или другие хорошо известные гетероциклические заместители. Мономеры нуклеиновой кислоты могут быть связаны фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Нуклеиновые кислоты могут быть как одноцепочечными, так и двухцепочечными.

[98] Термин «рецептор химерного антигена» (CAR) относится к молекулам, которые объединяют связывающий домен против компонента, присутствующего на клетке-мишени, например, со специфичностью на основе антител в отношении желаемого антигена (например, опухолевого антигена, такого как MAGE-A4), с активирующим T-клеточным рецептором внутриклеточным доменом для образования химерного белка, который проявляет специфическую клеточную иммунную активность к мишени. Как правило, CAR состоят из внеклеточного связывающего домена одноцепочечного антитела (scFv), слитого с внутриклеточным сигнальным доменом дзета-цепи комплекса T-клеточного антигенного рецептора, и обладают способностью при экспрессии в T-клетках перенаправлять распознавание антигена на основе специфичности моноклональных антител.

[99] Термин «HLA» относится к системе или комплексу лейкоцитарного антигена человека (HLA), который представляет собой генный комплекс, кодирующий белки главного комплекса гистосовместимости (MHC) у людей. Эти белки клеточной поверхности отвечают за регуляцию иммунной системы человека. HLA, соответствующие MHC классу I (A, B и C), представляют пептиды внутри клетки. В контексте настоящей заявки пептид может быть «HLA-связанным», если он связан с системой или комплексом HLA. В некоторых вариантах осуществления HLA-связанный пептид находится на поверхности клетки.

[100] Термин «HLA-A» относится к группе лейкоцитарных антигенов человека (HLA), которые кодируются локусом HLA-A. HLA-A представляет собой один из трех основных типов рецепторов клеточной поверхности класса I MHC человека. Рецептор представляет собой гетеродимер и состоит из тяжелой α -цепи и меньшей β -цепи. α -цепь кодируется вариантом гена HLA-A, а β -цепь (β 2-микроглобулин) представляет собой инвариантную молекулу β 2-микроглобулина.

[101] Термин «HLA-A2» соответствует одной конкретной группе аллеля главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса I на локусе HLA-A; α -цепь кодируется геном HLA-A*02, а β -цепь кодируется локусом β 2-микроглобулина или B2M.

[102] Используемый в настоящем документе термин «вектор» включает, но не ограничивается, вирусный вектор, плазмиду, вектор РНК или линейную или кольцевую молекулу ДНК или РНК, которая может состоять из хромосомных, нехромосомных, полусинтетических или синтетических нуклеиновых кислот. В некоторых случаях векторы способны к автономной репликации (эписомальный вектор) и/или экспрессии нуклеиновых

кислот, с которыми они связаны (векторы экспрессии). Большое количество подходящих векторов известно специалистам в данной области техники и коммерчески доступно. Вирусные векторы включают ретровирус, аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированные вирусы), коронавирусы, вирусы с отрицательной цепью РНК, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и вирус везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, вирус кори и вирус Сендай), вирусы с положительной цепью РНК, такие как пикорнавирус и альфавирус, и вирусы с двухцепочечной ДНК, включая аденовирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна - Барр, цитомегаловирус) и поксвирус (например, вирус осповакцины, вирус оспы птиц и вирус оспы канареек). Другие вирусы включают, например, вирус Norwalk, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примеры ретровирусов включают: птичий вирус лейкоза-саркомы, вирусы С-типа, В-типа млекопитающих, вирусы D-типа, вирусы группы HTLV-BLV и лентивирус.

[103] «Костимулирующий домен» или «костимулирующая молекула» относится к распознаваемому партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ клетки, такой как, но не ограничиваясь этим, пролиферация. Костимулирующие молекулы включают, но не ограничиваются ими, молекулу МНС класса I, BTLA и рецептор Толл-лиганда. Примеры костимулирующих молекул включают CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137) (SEQ ID NO: 29), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т. п. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличную от рецептора антигена или его лигандов, которая необходима для эффективного иммунного ответа.

[104] «Костимулирующий лиганд» относится к молекуле на антигенпредставляющей клетке, которая специфически связывает родственную костимулирующую молекулу на Т-клетке, тем самым обеспечивая сигнал, который в дополнение к первичному сигналу, обеспечиваемому, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, нагруженной пептидом, опосредует Т-клеточный ответ, включая, помимо прочего, активацию пролиферации, дифференцировку и т. п. Костимулирующий лиганд может без ограничений включать CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцируемый костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, рецептор лимфотоксина бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, агонист или антитело, которое связывается с рецептором Толл-лиганда, и лиганд, который специфически связывается с B7-H3.

[105] Термин «костимулирующий сигнал» относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к пролиферации, и/или активации Т-клеток, и/или повышению или понижению экспрессии ключевых молекул.

[106] Используемый в настоящем документе термин «внеклеточный лиганд-связывающий домен» относится к олиго- или полипептиду, который способен связывать лиганд, например, молекулу клеточной поверхности. Например, внеклеточный лиганд-связывающий домен может быть выбран для распознавания лиганда, который действует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с конкретным болезненным состоянием (например, злокачественным новообразованием). Примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут действовать как лиганды, включают маркеры, связанные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунными заболеваниями и злокачественными клетками. Внеклеточный лиганд-связывающий домен может содержать области LCVR и HCVR (например, быть подготовлен в формате scFv), необязательно соединенные линкером.

[107] Термин «субъект» или «пациент», в контексте настоящего документа, включает всех представителей царства животных, включая приматов, отличных от человека, и человека. В одном варианте осуществления пациенты представляют собой людей со злокачественным новообразованием (например, множественной миеломой или меланомой).

[108] Используемый в настоящем документе «домен сигнальной трансдукции» или «сигнальный домен» CAR отвечает за внутриклеточный сигналинг после связывания внеклеточного лиганд-связывающего домена с мишенью, что приводит к активации иммунной клетки и иммунного ответа. Другими словами, домен сигнал трансдукции отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которой экспрессируется CAR. Например, эффекторная функция Т-клетки может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, включая секрецию цитокинов. Таким образом, термин «домен сигнальной трансдукции» относится к части белка, которая передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Примерами доменов сигнальной трансдукции для применения в CAR могут быть цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора и корецепторов, которые действуют совместно, инициируя сигналинг после взаимодействия антигенного рецептора, а также любые производные или варианты этих последовательностей и любые синтетические последовательности, имеющие такие же функциональные возможности. В некоторых случаях сигнальные домены включают два различных класса цитоплазматических сигнальных последовательностей: те, которые инициируют антиген-зависимую первичную активацию, и те, которые действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Мотивы ITAM представляют собой четко выраженные сигнальные мотивы, обнаруживаемые в интрацитоплазматическом хвосте различных рецепторов, которые выступают в роли сайтов связывания три тирозинкиназ класса syk/zap70. Примеры ITAM включают те, которые происходят из TCR-дзета, FcR-гамма,

FcR-бета, FcR-эпсилон, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В некоторых вариантах осуществления домен сигнальной трансдукции CAR может содержать сигнальный домен CD3-дзета (SEQ ID NO: 30).

Химерные антигенные рецепторы (CAR)

[109] Химерные антигенные рецепторы (CAR) могут перенаправлять специфичность Т-клеток к распознаваемым антителами антигенам на поверхности клеток (например, злокачественных клеток), независимо от того, экспрессируются ли эти антигены на поверхности клетки или экспрессируются внутриклеточно и представлены, например, HLA.

[110] Один аспект настоящего описания включает химерный антигенный рецептор (CAR), который специфичен в отношении антигена MAGE-A4, представленного на поверхности клеток, таких как опухолевые клетки. Это представление может быть осуществлено, например, с помощью HLA, такого как HLA-A2. В одном варианте осуществления настоящего описания CAR, как описано в настоящем документе, содержит внеклеточный специфичный для мишени связывающий домен, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен (такой как сигнальный домен, полученный из CD3-дзета или FcR-гамма) и/или одну или более костимулирующих сигнальных доменов, происходящих из костимулирующей молекулы, такой как, но не ограничиваясь этим, 4-1BB. В одном варианте осуществления CAR включает шарнир или спейсерную область между внеклеточным связывающим доменом и трансмембранным доменом, такую как шарнир CD8-альфа.

[111] Связывающий домен или внеклеточный домен CAR обеспечивает CAR способность связываться с представляющим интерес антигеном-мишенью. Связывающий домен (например, лиганд-связывающий домен или антигенсвязывающий домен) может быть любым белком, полипептидом, олигопептидом или пептидом, который обладает способностью специфически распознавать и связываться с биологической молекулой (например, рецептором клеточной поверхности или опухолевым белком либо его компонентом). Связывающий домен включает любого встречающегося в природе, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного партнера по связыванию для представляющей интерес биологической молекулы. Например, и как дополнительно описано в настоящем документе, связывающий домен может представлять собой переменные области легкой и тяжелой цепи антитела, или переменные области легкой и тяжелой цепей могут быть объединены вместе в одну цепь и в любой ориентации (например, VL-VH или VH-VL). Известны различные анализы для идентификации связывающих доменов настоящего описания, которые специфически связываются с конкретной мишенью, включая вестерн-блоттинг, ИФА, проточную цитометрию или анализ поверхностного плазмонного резонанса (например, с использованием анализа BIACORE). Мишенью может быть антиген, представляющий клинический интерес, против которого желательно запустить эффекторный иммунный ответ, приводящий к уничтожению опухоли. В одном варианте осуществления антиген-мишень связывающего

домена химерного антигенного рецептора представляет собой белок MAGE-A4 на поверхности опухолевых клеток (например, белок MAGE-A4, представляемый HLA, такой как белок MAGE-A4, представляемый белок HLA-A2).

[112] Иллюстративные лиганд-связывающие домены включают антигенсвязывающие белки, такие как антигенсвязывающие фрагменты антитела, например, scFv, scTCR, внеклеточные домены рецепторов, лиганды для молекул/рецепторов клеточной поверхности или их рецептор-связывающие домены и опухолевые связывающие белки. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены, включенные в CAR настоящего описания, могут представлять собой переменную область (Fv), CDR, Fab, scFv, VH, VL, вариант доменного антитела (dAb), верблюжье антитело (VHH), вариант 3 домена фибронектина, вариант анкириновых повторов и другой антигенспецифический связывающий домен, полученный из других белковых каркасов.

[113] В одном варианте осуществления связывающий домен CAR представляет собой одноцепочечное антитело к MAGE-A4 (scFv) и может представлять собой scFv мыши, человека или гуманизированный scFv. Одноцепочечные антитела можно клонировать из генов V-области гибридомы, специфичных для желаемой мишени. Методика, которую можно использовать для клонирования переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL), описана, например, в *Orlandi et al., PNAS*, 1989; 86: 3833-3837. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления связывающий домен содержит связывающий домен, полученный из антитела, но может быть связывающим доменом, не являющимся производным антитела. Связывающий домен, полученный из антитела, может представлять собой фрагмент антитела или продукт, полученный с помощью генной инженерии, одного или более фрагментов антитела, причем этот фрагмент участвует в связывании с антигеном.

[114] В некоторых вариантах осуществления CAR настоящего описания могут содержать линкер между различными доменами, добавленный для соответствующего расположения и конформации молекулы. Например, в одном варианте осуществления может быть линкер между связывающим доменом VH или VL, длина которого может составлять от 1 до 20 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер между любым из доменов химерного антигенного рецептора может иметь длину от 1 до 15 или 15 аминокислот. В связи с этим линкер может представлять собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот в длину. В дополнительных вариантах осуществления линкер может иметь длину 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. Диапазоны, включающие числа, описанные в настоящем документе, также включены в данный документ, например, линкер длиной 10-30 аминокислот.

[115] В некоторых вариантах осуществления линкеры, подходящие для применения в описанном в настоящем документе CAR, являются гибкими линкерами. Подходящие линкеры могут быть легко выбраны и могут иметь любую подходящую длину из различных вариантов длины, например, от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2

аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, включая от 4 аминокислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот, и могут иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот.

[116] Примеры гибких линкеров включают глициновые полимеры (G)_n, глицин-сериновые полимеры (GS)_n, где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере один, глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Глициновые и глицин-сериновые полимеры относительно неструктурированы и поэтому могут служить нейтральной связью между доменами слитых белков, таких как CAR, описанные в настоящем документе. Глицин имеет доступ к значительно большему количеству фи-пси пространству, чем даже аланин, и значительно менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). Обычному специалисту в данной области техники понятно, что конструкция CAR может содержать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может содержать гибкий линкер, а также одну или более частей, которые придают менее гибкую структуру для обеспечения желаемой структуры CAR. Конкретные линкеры включают линкеры (G4S)_n, где n=1-3, как показано в SEQ ID NO: 23-25. Другой иллюстративный линкер представлен как SEQ ID NO: 26. Линкер может присутствовать между областями LCVR и HCVR CAR, между переменной областью (например, HCVR) и шарнирной областью (такой как шарнир CD8α) или и тем, и другим. Например, настоящее описание обеспечивает CAR, содержащий линкер (G4S)₃ между LCVR и HCVR и линкер (G4S)₁ между HCVR и шарниром CD8α.

[117] За связывающим доменом CAR может следовать «спейсер» или «шарнир», который относится к области, которая перемещает антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторной клетки, чтобы обеспечить надлежащий контакт клетки/клетки, связывание антигена и активацию (Patel *et al.*, *Gene Therapy*, 1999; 6: 412-419). Шарнирная область в CAR обычно находится между трансмембранным (TM) и связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и может быть шарнирной областью иммуноглобулина дикого типа или измененной шарнирной областью иммуноглобулина дикого типа. Другие иллюстративные шарнирные области, используемые в CAR, описанных в настоящем документе, включают шарнирную область, происходящую из внеклеточных областей мембранных белков типа 1, таких как CD8-альфа, CD4, CD28 и CD7, которые могут быть шарнирными областями дикого типа от этих молекул или могут быть изменены. В одном варианте осуществления шарнирная область включает шарнир CD8-альфа (SEQ ID NO: 27).

[118] «Трансмембранная» область или домен представляет собой часть CAR, которая прикрепляет внеклеточную связывающую часть к плазматической мембране иммунной эффекторной клетки и облегчает связывание связывающего домена с целевым антигеном. Трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен

CD3-дзета, однако можно использовать другие трансмембранные домены, включая те, которые получены из CD8-альфа, CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В одном варианте осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD137. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является синтетическим, и в этом случае он может содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

[119] «Внутриклеточный сигнальный домен» или «сигнальный домен» относится к части белка химерного антигенного рецептора, который участвует в трансдукции мРНК об эффективном связывании CAR с целевым антигеном во внутреннюю часть иммунной эффекторной клетки, чтобы вызвать функцию эффекторной клетки, например, активацию, продукцию цитокинов, пролиферацию и цитотоксическую активность, включая высвобождение цитотоксических факторов в CAR-связанную целевую клетку, или другие клеточные ответы, вызванные связыванием антигена с внеклеточным доменом CAR. Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторной функцией Т-клетки, например, может быть цитолитическая активность, или хелперная активность, включая секрецию цитокина. Таким образом, термины «внутриклеточный сигнальный домен» или «сигнальный домен», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к части белка, которая трансдуцирует сигнал эффекторной функции и которая направляет клетку на выполнение специализированной функции. Тогда как обычно может использоваться весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать весь домен. В той степени, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо всего домена до тех пор, пока она трансдуцирует сигнал эффекторной функции. Термин «внутриклеточный сигнальный домен» включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для трансдукции сигнала эффекторной функции. Внутриклеточный сигнальный домен также известен как «домен сигнальной трансдукции» и обычно происходит из частей человеческих цепей CD3 или FcR γ .

[120] Известно, что сигналов, генерируемых только через Т-клеточный рецептор, недостаточно для полной активации Т-клетки, и что также требуется вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток опосредуется двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антиген-зависимую первичную активацию через Т-клеточный рецептор (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). Цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют костимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы,

известные как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM.

[121] Примеры ITAM-содержащих первичных цитоплазматических сигнальных последовательностей, которые имеют особое применение в настоящем описании, включают последовательности, полученные из TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В одном конкретном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен описанных в настоящем документе CAR к MAGE-A4 получают из CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

[122] Используемый в настоящем документе термин «костимулирующий сигнальный домен» или «костимулирующий домен» относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от рецепторов антигена или Fc-рецепторов, которые обеспечивают второй сигнал, необходимый для эффективной активации и функционирования Т-лимфоцитов при связывании с антигеном. Примеры таких костимулирующих молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C, B7-H2 и лиганд, специфически связывающий CD83. Соответственно, хотя в настоящем описании представлены иллюстративные костимулирующие домены, полученные из CD3-дзета и 4-1BB, другие костимулирующие домены рассматриваются для применения с CAR, описанными в настоящем документе. Включение одного или более костимулирующих сигнальных доменов может повысить эффективность и наращивание Т-клеток, экспрессирующих рецепторы CAR. Внутриклеточные сигнальные и костимулирующие сигнальные домены могут быть связаны в любом порядке тандемно с карбоксильным концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

[123] Несмотря на то, что CAR на основе scFv, сконструированные так, чтобы содержать сигнальный домен из CD3 или FcR-гамма, как было показано, доставляют мощный сигнал для активации Т-клеток и эффекторной функции, их недостаточно для выработки сигналов, которые способствуют выживаемости и наращиванию Т-клеток в отсутствие сопутствующего костимулирующего сигнала. Другие CAR, содержащие связывающий домен, шарнирный, трансмембранный и сигнальный домен, полученный из CD3-дзета или FcR-гамма, вместе с одним или более костимулирующими сигнальными доменами (например, внутриклеточные костимулирующие домены, полученные из CD28, CD137, CD134 и CD278) могут более эффективно направлять противоопухолевую активность, а также повышать секрецию цитокинов, литическую активность, выживаемость и пролиферацию CAR-экспрессирующих Т-клеток *in vitro*, а также в моделях на животных и у пациентов с онкологическими заболеваниями (Milone *et al.*, *Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong *et al.*, *Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito *et al.*, *PNAS*, 2009; 106:3360-3365).

[124] В различных вариантах осуществления CAR к MAGE-A4 согласно настоящему описанию содержат (a) scFv к MAGE-A4 в качестве связывающего домена (например, scFv, имеющий связывающие области (например, CDR или варьируемые домены) из антитела к MAGE-A4, идентифицированного в таблице 1) (b) шарнирную область, полученную из CD8-альфа человека, (c) трансмембранный домен CD8-альфа человека и (d) внутриклеточный сигнальный домен дзета-цепи CD3 (CD3) T-клеточного рецептора человека, и необязательно один или более костимулирующих сигнальных доменов, например, 4-1BB. В одном варианте осуществления различные белковые домены расположены от N-конца до C-конца в следующем порядке: связывающий домен, шарнирная область и трансмембранный домен. Внутриклеточный сигнальный домен и необязательные костимулирующие сигнальные домены связаны с трансмембранным C-концом в любом порядке тандемно с образованием одноцепочечного химерного полипептида. В одном варианте осуществления конструктор нуклеиновой кислоты, кодирующий CAR к MAGE-A4, представляет собой молекулу химерной нуклеиновой кислоты, включающую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую различные кодирующие последовательности, например (от 5' до 3') кодирующие последовательности человеческого scFv к MAGE-A4, шарнир CD8-альфа человека, трансмембранный домен CD8-альфа человека и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. В еще одном варианте осуществления конструктор нуклеиновой кислоты, кодирующий CAR к MAGE-A4, представляет собой молекулу химерной нуклеиновой кислоты, включающую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую различные кодирующие последовательности, например (от 5' до 3') кодирующие последовательности человеческого scFv к MAGE-A4, шарнир CD8-альфа человека, трансмембранный домен CD8-альфа человека, костимулирующий домен 4-1BB и костимулирующий домен CD3-дзета.

[125] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий описанный в настоящем документе CAR, вставлен в вектор. Вектор представляет собой носитель, в который может быть ковалентно вставлен полинуклеотид, кодирующий белок, чтобы вызвать экспрессию этого белка и/или клонирование полинуклеотида. Такие векторы также могут называться «векторами экспрессии». Выделенный полинуклеотид может быть вставлен в вектор с использованием любых подходящих способов, известных в данной области техники, например, но не ограничиваясь этим, вектор может быть расщеплен с использованием подходящих ферментов рестрикции, а затем может быть лигирован с выделенным полинуклеотидом, имеющим совпадающие рестрикционные концы. Векторы экспрессии могут иметь способность включать и экспрессировать гетерологичные или модифицированные последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие по меньшей мере часть генного продукта, способного транскрибироваться в клетке. В большинстве случаев молекулы РНК затем транслируются в белок. Векторы экспрессии могут содержать множество регуляторных последовательностей, которые относятся к последовательностям нуклеиновой кислоты, необходимым для транскрипции и, возможно, трансляции функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-

хозяине. В дополнение к контрольным последовательностям, которые регулируют транскрипцию и трансляцию, векторы и векторы экспрессии могут содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые также выполняют другие функции и обсуждаются ниже. Вектор экспрессии может содержать дополнительные элементы, например, вектор экспрессии может иметь две системы репликации, что позволяет поддерживать его в двух организмах, например, в клетках человека для экспрессии и в прокариотическом хозяине для клонирования и амплификации.

[126] Вектор экспрессии может иметь необходимые 5'- и 3'-регуляторные элементы, такие как промоторные последовательности, такие как промоторы CMV, PGK и EF1-альфа, ТАТА-боксы распознавания и связывания рибосом, и последовательность терминации транскрипции AAUAAA 3'-UTR для эффективной транскрипции и трансляции гена в соответствующей клетке-хозяине. Другие подходящие промоторы включают конститутивный ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор LTR ВИЧ, промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно ранний промотор EBV и промотор вируса саркомы Рауса. Также можно использовать промоторы генов человека, включая, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. В некоторых вариантах осуществления индуцируемые промоторы также рассматриваются как часть векторов, экспрессирующих химерный антигенный рецептор. Это обеспечивает молекулярный переключатель, способный включить экспрессию представляющей интерес полинуклеотидной последовательности или выключить экспрессию. Примеры индуцибельных промоторов включают, но не ограничиваются ими, промотор металлотинина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона или промотор тетрациклина.

[127] Вектор экспрессии может иметь дополнительную последовательность, такую как бх-гистиридиновые метки, метки с-Мус и FLAG, которые включены в экспрессируемые CAR. Таким образом, вектор экспрессии может быть сконструирован таким образом, чтобы он содержал 5'- и 3'-нетранслируемые регуляторные последовательности, которые иногда могут функционировать как энхансерные последовательности, промоторные области и/или терминаторные последовательности, которые могут облегчить или усилить эффективную транскрипцию представляющей интерес нуклеиновой кислоты (кислот), переносимой в вектор экспрессии. Вектор экспрессии также может быть сконструирован для функции репликации и/или экспрессии (например, транскрипции и трансляции) в конкретном типе клетки, расположении клетки или типе ткани. Векторы экспрессии могут включать селективируемый маркер для поддержания вектора в клетке-хозяине или реципиентной клетке.

[128] В различных вариантах осуществления векторы представляют собой плазмиду, автономно реплицирующиеся последовательности и транспозируемые элементы. Дополнительные иллюстративные векторы включают, но не ограничиваясь этим, плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как искусственная

хромосома дрожжей (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома на основе P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, и вирусы животных. Примеры категорий вирусов животных, используемых в качестве векторов, включают, но не ограничиваясь этим, ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус и паповавирус (например, SV40). Примерами векторов экспрессии являются векторы Lenti-X™ Bicistronic Expression System (Neo) (Clontech), векторы pCIneo (Promega) для экспрессии в клетках млекопитающих; векторы pLenti4/V5-DEST.TM., pLenti6/V5-DEST.TM. и pLenti6.2N5-GW/lacZ (Invitrogen) для опосредуемого лентивирусом переноса гена и экспрессии в клетках млекопитающих. Кодированные последовательности CAR, описанные в настоящем документе, можно лигировать в такие векторы экспрессии для экспрессии химерного белка в клетках млекопитающих.

[129] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR настоящего описания, представлены в вирусном векторе. Вирусный вектор может быть получен из ретровируса, лентивируса или пенящего вируса. Используемый в настоящем документе термин «вирусный вектор» относится к конструктору вектора нуклеиновой кислоты, которая включает по меньшей мере один элемент вирусного происхождения и обладает способностью упаковываться в частицу вирусного вектора. Вирусный вектор может содержать кодирующую последовательность для различных химерных белков, описанных в настоящем документе, вместо несущественных вирусных генов. Вектор и/или частицу можно использовать для переноса ДНК, РНК или других нуклеиновых кислот в клетки либо *in vitro*, либо *in vivo*. В данной области техники известны многочисленные формы вирусных векторов.

[130] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор, содержащий кодирующую последовательность для CAR, описанного в настоящем документе, представляет собой ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Термин «ретровирусный вектор» относится к вектору, содержащему структурные и функциональные генетические элементы, которые в основном получены из ретровируса. Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, содержащему структурные и функциональные генетические элементы вне LTR, которые в основном получены из лентивируса.

[131] Ретровирусные векторы, применяемые в настоящем документе, могут быть получены из любого известного ретровируса (например, ретровирусов типа с, таких как вирус саркомы мышей Молони (MoMSV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкоза гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошек (FLV), спумавирус, вирус лейкоза Френда, вирус стволовых клеток мыши (MSCV) и вирус саркомы Рауса (RSV)). Ретровирусы настоящего описания также включают вирусы Т-клеточного лейкоза человека, HTLV-1 и HTLV-2, и лентивирусное семейство ретровирусов, таких как вирусы иммунодефицита человека, HIV-1, HIV-2, вирус

иммунодефицита обезьян (SIV), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита лошадей (EIV) и другие классы ретровирусов.

[132] Lentiviral vector, used in this document, refers to a vector, derived from a lentivirus, of the group (or genus) of retroviruses, which cause a slowly progressive disease. Included in this group are viruses including human immunodeficiency virus (HIV; including HIV type 1 and HIV type 2); visna-medi; virus of arthritis-encephalitis of goats; virus of infectious anemia of horses; virus of immunodeficiency of felines (FIV); virus of immunodeficiency of large ruminants (BIV); and virus of immunodeficiency of monkeys (SIV). Production of recombinant lentivirus can be achieved using methods according to Dull *et al.* and Zufferey *et al.* (Dull *et al.*, *J. Virol.*, 1998; 72: 8463-8471 and Zufferey *et al.*, *J. Virol.* 1998; 72:9873-9880).

[133] Retroviral vectors (i.e. and lentiviral, and non-lentiviral) for use in this description can be formed using standard methods of cloning by combining required sequences of DNA in order and orientation, described in this document (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), sections 9.10-9.14 and other standard laboratory manuals; Eglitis, *et al.* (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460-6464; Wilson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury *et al.* (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-7644; Kay *et al.* (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu *et al.* (1993) *J. Immunol* 150:4104-4115; patent USA № 4,868,116; patent USA № 4,980,286; PCT application № WO 89/07136; PCT application № WO 89/02468; PCT application № WO 89/05345; and PCT application № WO 92/07573).

[134] Suitable sources for obtaining retroviral (i.e. as lentiviral, and non-lentiviral) sequences for use in obtaining vectors include, for example, genomic DNA and cDNA, available from commercially available sources, including the American collection of type cultures (ATCC), G. Rockville, Maryland. Sequences can also be synthesized chemically.

[135] For expression of CAR to MAGE-A4 vector can be introduced into the host cell, to ensure expression of the polypeptide in the host cell. Expression vectors can contain a number of elements for regulation of expression, including, in addition to the promoter sequences, sequences for initiation of transcription, enhancer sequences, selectable markers and signal sequences. These elements can be selected in a manner appropriate to the specialist in this field of technology, as described in this document. For example, promoter sequences can be selected for stimulation of transcription.

полинуклеотида в векторе. Подходящие промоторные последовательности включают, но не ограничиваясь этим, промотор T7, промотор T3, промотор SP6, промотор бета-актина, промотор EF1a, промотор CMV и промотор SV40. Для усиления транскрипции полинуклеотида могут быть выбраны энхансерные последовательности. Селектируемые маркеры могут быть выбраны для обеспечения возможности отбора клеток-хозяев, вставленных с вектором, из тех, которые не являются, например, селектируемые маркеры могут быть генами, которые придают устойчивость к антибиотикам. Сигнальные последовательности могут быть выбраны, чтобы обеспечить транспортировку экспрессированного полипептида за пределы клетки-хозяина.

[136] Для клонирования полинуклеотида вектор можно ввести в клетку-хозяин (выделенную клетку-хозяин), чтобы обеспечить репликацию самого вектора и тем самым амплифицировать копии содержащегося в нем полинуклеотида. Клонирование векторы могут содержать компоненты последовательности, которые обычно включают, но не ограничиваясь этим, точку начала репликации, промоторные последовательности, промоторы инициации транскрипции, энхансерные последовательности и селектируемые маркеры. Данные элементы могут быть выбраны соответствующим образом специалистом в данной области техники. Например, точка начала репликации может быть выбрана для стимуляции автономной репликации вектора в клетке-хозяине.

[137] В некоторых вариантах осуществления настоящее описание обеспечивает выделенные клетки-хозяева, содержащие векторы, представленные в настоящем документе. Клетки-хозяева, содержащие вектор, могут быть полезны для экспрессии или клонирования полинуклеотида, содержащегося в векторе. Подходящие клетки-хозяева могут включать, но не ограничиваясь этим, прокариотические клетки, клетки гриба, дрожжевые клетки или клетки высших эукариот, например, клетки млекопитающих. Подходящие прокариотические клетки для этой цели включают, но не ограничиваясь этим, эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans*, и *Shigella*, а также *Bacilli*, например, *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas*, например, *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*.

[138] CAR настоящего описания можно вводить в клетку-хозяина с использованием методов трансфекции и/или трансдукции, известных в данной области техники. Используемые в настоящем документе термины «трансфекция» и «трансдукция» относятся к процессам, посредством которых экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты вводится в клетку-хозяин. Нуклеиновая кислота может быть интегрирована в ДНК клетки-хозяина или может сохраняться вне хромосом. Нуклеиновая кислота может сохраняться транзитивно или может быть стабильной. Трансфекция может осуществляться различными способами, известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, соосаждение ДНК фосфатом кальция, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, опосредованную полибренном трансфекцию, электропорацию, микроинъекцию, слияние

липосом, липофекцию, слияние протопластов, ретровирусную инфекцию и биобаллистику. Трансдукция относится к доставке гена (-ов) с использованием вирусного или ретровирусного вектора посредством вирусной инфекции, а не путем трансфекции. В некоторых вариантах осуществления ретровирусные векторы трансдуцируют путем упаковки векторов в вирионы перед приведением в контакт с клеткой. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая CAR к MAGE-A4, переносимая ретровирусным вектором, может быть трансдуцирована в клетку посредством инфекции и интеграции провируса.

[139] Используемый в данном документе термин «полученный с помощью генной инженерии» или «генетически модифицированный» относится к добавлению дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК в общий генетический материал в клетке. Термины «генетически модифицированные клетки», «модифицированные клетки» и «перенаправленные клетки» используются взаимозаменяемо.

[140] В частности, CAR настоящего описания вводится и экспрессируется в иммунных эффекторных клетках, чтобы перенаправить их специфичность на представляющий интерес антиген-мишень, например, злокачественную клетку, экспрессирующую MAGE-A4, такую как злокачественная клетка, представляющую MAGE-A4 с HLA-A2.

[141] В настоящем описании предложены способы получения иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют CAR, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления способ включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных от субъекта, такого как субъект, имеющий опухолевую клетку, экспрессирующую MAGE-A4, так что иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или более CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки выделяют от индивидуума и генетически модифицируют без дополнительных манипуляций *in vitro*. Такие клетки можно затем повторно вводить индивидууму. В дополнительных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки сначала активируют и стимулируют для пролиферации *in vitro* перед их генетической модификацией для экспрессии CAR. В этом отношении иммунные эффекторные клетки можно культивировать до или после генетической модификации (т. е. трансдукции или трансфекции для экспрессии CAR, как описано в настоящем документе).

[142] Перед манипуляциями *in vitro* или генетической модификацией иммунных эффекторных клеток, описанных в настоящем документе, источник клеток может быть получен от субъекта. В частности, иммунные эффекторные клетки для применения с CAR, как описано в настоящем документе, содержат Т-клетки. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая моноклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань вилочковой железы, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах

осуществления Т-клетки могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта, с использованием любого количества способов, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение в градиенте фиколла. В одном варианте осуществления клетки из циркулирующей крови индивидуума получают посредством афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоцит, В-клетки, другие ядросодержащие белые клетки крови, эритроциты и тромбоциты. В одном варианте осуществления клетки, собранные посредством афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для дальнейших этапов обработки. В одном варианте осуществления настоящего описания клетки промывают PBS. В альтернативном варианте осуществления раствор для промывания не содержит кальций и может не содержать магний или может не содержать многие, если не все, двухвалентные катионы. Специалистам в данной области техники будет понятно, что этап промывки может выполняться способами, известными специалистам в данной области техники, например, с использованием полуавтоматической проточной центрифуги. После промывания клетки могут быть ресуспендированы в различных биосопоставимых буферах или другом солевом растворе с буфером или без него. В некоторых вариантах осуществления нежелательные компоненты образца афереза могут быть удалены в культуральной среде, непосредственно ресуспендированной клетками.

[143] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) путем лизирования эритроцитов и истощения моноцитов, например, центрифугированием в градиенте PERCOLL™. Конкретная субпопуляция Т-клеток, таких как CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+, и CD45RO+ Т-клетки может быть дополнительно выделена методиками положительной или отрицательной селекции. Например, обогащение популяции Т-клеток путем отрицательного отбора может быть достигнуто с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отобранных клеток. Один способ для применения в настоящем документе представляет собой сортировку и/или селекции клеток посредством отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которых применяют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры поверхности клетки, присутствующие на отрицательно выбранных клетках. Например, для обогащения CD4+ клеток путем отрицательной селекции коктейль моноклональных антител, как правило, включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Проточную цитометрию и сортировку клеток также можно применять для выделения представляющих интерес популяции клеток для применения по настоящему описанию.

[144] МКПК можно использовать непосредственно для генетической модификации CAR с использованием способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления после выделения МКПК дополнительно выделяют Т-лимфоциты, и в определенных вариантах осуществления как цитотоксические, так и Т-хелперы можно разделить на субпопуляции наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток

либо до, либо после генетической модификации и/или наращивания. CD8⁺ клетки можно получить стандартными способами. В некоторых вариантах осуществления CD8⁺ клетки дополнительно сортируют на наивные клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации поверхностных антигенов клетки, которые связаны с каждым из этих типов CD8⁺ клеток. В вариантах осуществления Т-клетки памяти присутствуют как в субпопуляциях CD62L⁺, так и в CD62L⁻CD8⁺ лимфоцитов периферической крови. МКПК разделяют на фракции CD62L⁻CD8⁺ и CD62L⁺CD8⁺ после окрашивания антителами к CD8 и CD62L. В некоторых вариантах осуществления экспрессия фенотипических маркеров ТСМ центральной памяти включает CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и CD127 и является отрицательной в отношении гранзима В. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки центральной памяти представляют собой CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки являются отрицательными в отношении CD62L, CCR7, CD28 и CD127 и положительными в отношении гранзима В и перфорина. В некоторых вариантах осуществления наивные CD8⁺ Т-лимфоциты характеризуются экспрессией фенотипических маркеров наивных Т-клеток, включая CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 и CD45RA.

[145] В некоторых вариантах осуществления CD4⁺ Т-клетки дополнительно разделяют на субпопуляции. Например, CD4⁺ Т-хелперы можно разделить на наивные клетки, клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций, которые имеют антигены клеточной поверхности. CD4⁺ лимфоциты можно получить стандартными способами. В некоторых вариантах осуществления наивные CD4⁺ Т-лимфоциты представляют собой CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺CD4⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления CD4⁺ клетки центральной памяти являются CD62L⁻положительными и CD45RO⁻положительными. В некоторых вариантах осуществления эффекторные CD4⁺ клетки являются CD62L⁻ и CD45RO⁻ отрицательными.

[146] Иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, могут быть генетически модифицированы после выделения с использованием известных способов, или иммунные эффекторные клетки могут быть активированы и наращены (или дифференцированы в случае предшественников) *in vitro* перед генетической модификацией. В другом варианте осуществления иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицированы описанными в настоящем документе химерными антигенными рецепторами (например, трансдуцированы вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR), а затем их активируют и наращивают *in vitro*. Способы активации и наращивания Т-клеток известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 6,905,874; патент США № 6,867,041; патент США № 6,797,514; WO2012079000. Как правило, такие способы включают приведение в контакт МКПК или выделенных Т-клеток со стимулирующим агентом и костимулирующим агентом, например, антителами к CD3 и к CD28, как правило, присоединенными к частице или другой поверхности, в культуральной среде с соответствующими цитокинами, такими как IL-2. Антитела к CD3 и к CD28, присоединенные к одной и той же частице, служат

«суррогатными» антигенпредставляющими клетками (АПК). В других вариантах осуществления Т-клетки могут быть активированы и стимулированы для пролиферации питающими клетками и соответствующими антителами и цитокинами с использованием способов, таких как те, что описаны в патентах США № 6,040,177; патент США № 5,827,642; и WO2012129514.

[147] В настоящем описании представлена популяция модифицированных иммунных эффекторных клеток для лечения пациента, имеющего злокачественное новообразование, вызванное опухолью, экспрессирующей MAGE-A4, например, множественной миеломой или меланомой, при этом модифицированные иммунные эффекторные клетки, содержащие CAR к MAGE-A4, описаны в настоящем документе.

[148] CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, полученные, как описано в настоящем документе, можно использовать в способах и композициях адоптивной иммунотерапии в соответствии с известными методиками или их вариациями, которые будут очевидны специалистам в данной области техники на основании данного описания. См., например, публикацию заявки на патент США № 2003/0170238, заявители Gruenberg et al; см. также патент США № 4,690,915, заявитель Rosenberg.

[149] В некоторых вариантах осуществления клетки получают, сначала извлекая их из культуральной среды, а затем промывая и концентрируя в среде и системе контейнеров, пригодных для введения («фармацевтически приемлемый» носитель) в эффективном для лечения количестве. Подходящей инфузионной средой может быть любой состав изотонической среды, как правило, физиологический раствор, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), но также можно использовать 5% декстрозу в воде или лактат Рингера. Инфузионная среда может быть дополнена человеческим сывороточным альбумином.

[150] Эффективное для лечения количество клеток в композиции составляет по меньшей мере 2 клетки (например, по меньшей мере 1 CD8⁺ Т-клетка центральной памяти и по меньшей мере 1 субпопуляциях CD4⁺ Т-лимфоцитов) или, как правило, больше 10² клеток и до 10⁶, включая 10⁸ или 10⁹ клеток, и может быть больше 10¹⁰ клеток. Количество клеток будет зависеть от конечного применения, для которого предназначена композиция, а также от типа содержащихся в ней клеток.

[151] Клетки могут быть аутологичными или гетерологичными по отношению к пациенту, проходящему терапию. При желании лечение может также включать введение митогенов (например, РНА) или лимфокинов, цитокинов и/или хемокинов (например, IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α , IL-18, и TNF- β , GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α и т. д.), как описано в настоящем документе, для усиления индукции иммунного ответа.

[152] Популяции экспрессирующих CAR иммунных эффекторных клеток настоящего описания можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, например, IL-2 или другими цитокинами, либо популяцией клеток. Вкратце, фармацевтические композиции настоящего описания могут содержать популяцию экспрессирующих CAR

иммунных эффекторных клеток, таких как Т-клетки, как описано в настоящем документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный буферный солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстран, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адьюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции настоящего описания предпочтительно составляют для внутривенного введения.

[153] Противоопухолевый иммунный ответ, индуцированный у субъекта введением экспрессирующих CAR Т-клеток, описанных в настоящем документе, с использованием описанных в настоящем документе способов или других способов, известных в данной области техники, может включать клеточные иммунные ответы, опосредованные цитотоксическими Т-клетками, способными убивать инфицированные клетки, ответы регуляторных Т-клеток и хелперных Т-клеток. Также могут быть индуцированы гуморальные иммунные ответы, опосредованные в первую очередь хелперными Т-клетками, способными активировать В-клетки, что приводит к продукции антител. Для анализа типа иммунных ответов, индуцируемых композициями настоящего описания, могут использоваться различные методы, которые хорошо описаны в текущем уровне техники; например, *Current Protocols in Immunology*, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

[154] Таким образом, настоящее описание обеспечивает способы лечения индивидуума, у которого диагностировано или подозревается наличие либо риск развития злокачественного новообразования, характеризуемого, по меньшей мере частично, экспрессией MAGE-A4 злокачественными клетками (например, экспрессирующими MAGE-A4 клетками солидной опухоли), включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества экспрессирующих CAR иммунных эффекторных клеток, как описано в настоящем документе.

[155] В одном варианте осуществления настоящее описание обеспечивает способ лечения субъекта, у которого диагностировано злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, включающий извлечение эффекторных иммунных клеток у субъекта, у которого диагностировано злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, генетическую модификацию указанных иммунных эффекторных клеток с помощью вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор настоящего описания, тем самым создавая популяцию модифицированных иммунных эффекторных клеток, и введение популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток тому же субъекту. В одном варианте осуществления эффекторные иммунные клетки включают Т-клетки.

[156] Способы введения описанных в настоящем документе композиций клеток

включают любой способ, который эффективен для повторного введения *ex vivo* генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые либо непосредственно экспрессируют CAR согласно настоящему описанию у субъекта, либо при повторном введении генетически модифицированных предшественников иммунных эффекторных клеток, которые при введении субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие CAR. Один способ включает трансдукцию Т-клеток периферической крови *ex vivo* конструктором нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим описанием и возвращение трансдуцированных клеток субъекту.

Связывающие свойства химерных антигенных рецепторов и соответствующих антител

[157] Используемый в настоящем документе термин «связывание» обсуждается в контексте связывания химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела (или биспецифического антитела), например, с заранее определенным антигеном, таким как белок клеточной поверхности или его фрагмент (или с антигеном, связанным с белком клеточной поверхности, таким как молекула HLA). Связывание, как правило, относится к взаимодействию или ассоциации между минимум двумя объектами или молекулярными структурами, например, взаимодействию антигенсвязывающий домен: антиген.

[158] Например, аффинность связывания, как правило, соответствует значению K_D примерно 10^{-7} М или меньше, например, примерно 10^{-8} М или меньше, например, примерно 10^{-9} М или меньше, при определении, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) в приборе BIAcore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда и антитела или химерного антигенного рецептора в качестве аналита (или антилиганда). Также обычно используются стратегии связывания на основе клеток, такие как анализы связывания методом флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS), и данные FACS хорошо коррелируют с другими методами, такими как конкурентное связывание радиолигандов и ППР (Benedict, CA, *J Immunol Methods*. 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA, et al. *J Immunol Methods*. 2005, 302(1-2):68-77).

[159] Соответственно, химерный антигенный рецептор или соответствующее антитело (или биспецифическое антитело) настоящего описания связывается с заранее определенным антигеном или молекулой клеточной поверхности (рецептором), имеющей аффинность, соответствующую значению K_D , которое по меньшей мере в десять раз ниже, чем его аффинность для связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином). Как описано в настоящем документе, химерный антигенный рецептор или соответствующее антитело настоящего описания может связываться с представляемым HLA антигеном MAGE-A4, например, с представляемым HLA-A2 антигеном MAGE-A4. Согласно настоящему описанию аффинность химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела со значением K_D , которое равно или меньше чем в десять раз ниже, чем у неспецифического антигена, можно рассматривать как необнаруживаемое связывание.

[160] Термин « K_D » (М) относится к константе равновесия диссоциации

взаимодействия конкретного антигенсвязывающего домена с антигеном или константе равновесия диссоциации соответствующего антитела к антигену. Между K_D и аффинностью связывания существует обратная зависимость, поэтому чем меньше значение K_D , тем выше, т. е., сильнее, аффинность. Таким образом, термины «более высокая аффинность» или «более сильная аффинность» относятся к более высокой способности вступать во взаимодействие и, следовательно, к меньшему значению K_D , и, наоборот, термины «более низкая аффинность» или «более слабая аффинность» относятся к более низкой способности вступать во взаимодействие и, следовательно, большему значению K_D . В некоторых обстоятельствах более высокая аффинность связывания (или K_D) конкретной молекулы (например, химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела) с молекулой-партнером (например, антигеном X) по сравнению с аффинностью связывания молекулы (например, химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела) с другой взаимодействующей молекулой-партнером (например, антигеном Y) может быть выражена в виде коэффициента связывания, определяемого путем деления большего значения K_D (более низкая или более слабая аффинность) на меньшую K_D (более высокая или более сильная аффинность), например, может быть выражена как 5-кратное или 10-кратное превышение аффинности связывания, в зависимости от конкретного случая.

[161] Термин « k_d » (сек-1 или 1/с) относится к константе скорости диссоциации взаимодействия конкретного антигенсвязывающего домена с антигеном или к константе скорости диссоциации химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела. Указанное значение также называется значением k_{off} .

[162] Термин « k_a » ($M^{-1} \times \text{сек}^{-1}$ или 1/M) относится к константе скорости ассоциации взаимодействия конкретного антигенсвязывающего домена с антигеном или к константе скорости ассоциации химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела.

[163] Термин « K_A » (M^{-1} или 1/M) относится к константе равновесия ассоциации для взаимодействия конкретный антигенсвязывающий домен: антиген или константе равновесия ассоциации химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела. Равновесную константу ассоциации получают делением k_a на k_d .

[164] Термин «EC₅₀» или «EC₅₀» относится к полумаксимальной эффективной концентрации, которая включает концентрацию химерного антигенного рецептора, которая вызывает ответ на половину между исходным уровнем и максимумом после определенного времени воздействия. EC₅₀ по существу представляет собой концентрацию химерного антигенного рецептора или антитела (например, биспецифического антитела), при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. В некоторых вариантах осуществления значение EC₅₀ равно концентрации химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела настоящего описания, которая дает полумаксимальное связывание с клетками, экспрессирующими антиген (например, опухолеассоциированный антиген, такой как MAGE-A4), как определено, например, при помощи анализа связывания методом FACS и/или биоанализом Т-клеточного репортера/антигенпредставляющей клетки (АПК). Таким образом, сниженное или более слабое связывание наблюдается при

повышенном значении EC_{50} или половине от максимальной эффективной концентрации.

[165] В одном варианте осуществления сниженное связывание может быть определено как повышенная концентрация EC_{50} биспецифического антитела, антигенсвязывающего фрагмента, химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела, которая обеспечивает связывание с полумаксимальным количеством клеток-мишеней.

Варианты последовательностей антител и химерных антигенных рецепторов

[166] Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и химерные антигенные рецепторы настоящего описания могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасной области (FR) и/или определяющей комплементарность области (CDR) переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены отдельные антигенсвязывающие домены соответствующих антител. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и химерные антигенные рецепторы настоящего описания могут содержать антигенсвязывающие домены, происходящие из любой из иллюстративных аминокислотных последовательностей CDR или переменной области, описанных в настоящем документе, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или областях CDR мутированы в соответствующий остаток (остатки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено соответствующее антитело, или в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего (-их) остатка (остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательности в совокупности называются в настоящем документе «мутациями зародышевой линии»). Специалист в данной области техники, начиная с описанных в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получить многочисленные антитела, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах V_H и/или V_L мутированы обратно в остатки, содержащиеся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой был первоначально получен антигенсвязывающий домен. В других вариантах осуществления только некоторые остатки мутированы обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например только мутированные остатки, содержащиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, содержащиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более каркасных остатков и/или остатков CDR мутированы в соответствующий (-ие) остаток (остатки) другой последовательности зародышевой линии (т. е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от

последовательности зародышевой линии, из которой был первоначально получен антигенсвязывающий домен). Кроме того, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, например, при которых некоторые отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или мутированы в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии.

Биологические характеристики химерных антигенных рецепторов и соответствующих антител

[167] В настоящем описании предложены антитела (включая биспецифические антитела), антигенсвязывающие фрагменты и химерные антигенные рецепторы (CAR) с антигенсвязывающими доменами, полученными из антител, которые связываются с MAGE-A4 человека или с MAGE-A4 и CD3 человека. Как описано в настоящем документе, биспецифические антитела можно использовать для получения CAR со свойствами, аналогичными биспецифическим антителам. Таким образом, описываемые в настоящем документе и приписываемые биспецифическим антителам свойства также относятся и к CAR. Например, настоящее описание включает антитела к MAGE-A4, которые связываются с MAGE-A4 человека с величиной EC_{50} менее чем 2 нМ и с отношением S/N более чем 1900 по результатам измерения с использованием анализа с добавлением пептида на основе проточной цитометрии, как описано ниже при обсуждении примера 2. В качестве другого примера, в настоящем описании предложены антитела к MAGE-A4, которые связываются с одним или более родственным MAGE-A4 пептидом с отношениями S/N в диапазоне от примерно 5 до более чем 300, по результатам измерения с использованием анализа с добавлением пептида на основе проточной цитометрии примера 2, и как подробно описано в примере 3. В качестве другого примера, в настоящем описании предложены биспецифические антитела к MAGE-A4 × CD3, которые связываются с одним или более родственным MAGE-A4 пептидом с отношениями S/N в диапазоне от примерно 5 до более чем 240, по результатам измерения с использованием анализа с добавлением пептида на основе проточной цитометрии примера 2, и как подробно описано в примере 3.

[168] В настоящем описании также предложены биспецифические антитела к MAGE-A4 × CD3, которые демонстрируют существенную активность в биоанализе Т-клеточного репортера/антигенпредставляющей клетки (АПК), как подробно описано ниже в примере 4. Более конкретно, биспецифические антитела к MAGE-A4 × CD3 настоящего описания могут активировать транскрипцию/трансляцию генов NF-κB-зависимых Т-клеток (например, клетки Jurkat) по результатам экспрессии люциферазы в присутствии антигенпредставляющих клеток, экспрессирующих MAGE-A4 и HLA-A2 (например, клеток IM9 и U266B1) с величинами EC_{50} менее чем 3,2 нМ (клетки U266B1) или менее чем 0,75 нМ. Включение антитела к CD28 в биоанализ Т-клеточного репортера/антигенпредставляющей клетки (АПК) может модулировать активность

биспецифических антител к MAGE-A4 × CD3 в зависимости от эндогенных уровней CD80 и CD86, как подробно описано ниже в примере 4.

[169] В настоящем описании также предложены биспецифические антитела к MAGE-A4 × CD3, которые демонстрируют существенную активность в обсуждаемом выше биоанализе Т-клеточного репортера/антигенпредставляющей клетки (АПК) с одним или более родственным MAGE-A4 пептидом, как подробно описано ниже в примере 5. Более конкретно, биспецифические антитела к MAGE-A4 × CD3 демонстрируют субнанолярные величины EC_{50} (например, $2,10E-11$ М для биспецифического антитела с плечом к CD3 с высокой аффинностью, и $3,30E-10$ М для биспецифического антитела с плечом к CD3 со средней аффинностью) в терминах активности стимулированного репортера при инкубации в присутствии Т-клеток, несущих люциферазный репортер, и клеток Т2 с добавлением АОХ1₇₉₅₋₈₀₃. Кроме того, биспецифические антитела к MAGE-A4 × CD3 могут демонстрировать нанолярные величины EC_{50} (например, $1,30E-9$ М для биспецифического антитела с плечом к CD3 с высокой аффинностью, и $3,5E-9$ М для биспецифического антитела с плечом к CD3 со средней аффинностью) в терминах активности стимулированного репортера при инкубации в присутствии Т-клеток, несущих люциферазный репортер, и клеток Т2 с добавлением SHTN1₁₉₈₋₂₀₆.

[170] В настоящем описании также предложены биспецифические антитела к MAGE-A4 × CD3, способные направлять ответ Т-клеток (например, CD8⁺ Т-клеток, выделенных из МКПК человека) против опухолевых клеток (например, MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ антигенпредставляющих HLA-A2-положительных клеток IM9) по результатам основанного на визуализации мультиплексного анализа опосредованного первичными Т-клетками уничтожения, как подробно описано ниже в примере 6. Более конкретно, некоторые биспецифические антитела к MAGE-A4 × CD3 настоящего описания способны, при концентрациях менее чем 10 нМ (например, 6,6 нМ) снижать жизнеспособность опухолевых клеток благодаря антитело-зависимому опосредуемому Т-клетками ответу до менее чем 50% (например, 38%). Такое снижение жизнеспособности может быть по меньшей мере частично блокировано совместной инкубацией биспецифических антител к MAGE-A4 × CD3 с антителом к CD28 в условиях, когда опухолевые клетки эндогенно экспрессируют CD80 и CD86, что может быть по меньшей мере частично обусловлено блокированием антителом к CD28 взаимодействия CD28 с CD80 и CD86.

[171] В настоящем описании также предложены биспецифические антитела к MAGE-A4 × CD3, способные стимулировать высвобождение цитокинов при инкубации в присутствии опухолевых клеток (например, MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ антигенпредставляющих HLA-A2-положительных клеток IM9) и Т-клеток (например, CD8⁺ Т-клеток, выделенных из МКПК человека), как подробно описано ниже в примере 7. Более конкретно, в настоящем описании предложены биспецифические антитела к MAGE-A4 × CD3, способные стимулировать высвобождение цитокинов (например, IL2, IFN-γ) более чем 2-кратно по сравнению с высвобождением цитокинов в условиях, когда у опухолевых и Т-клеток отсутствуют биспецифические антитела к MAGE-A4 × CD3.

[172] В настоящем описании также предложены химерные антигенные рецепторы с антигенсвязывающими доменами, происходящими из соответствующих антител, которые специфически связываются с линиями клеток человека, которые экспрессируют эндогенный MAGE-A4, по данным анализа связывания методом FACS.

[173] В настоящем описании также предложены полученные генно-инженерными методами клетки, экспрессирующие MAGE-A4-специфические химерные антигенные рецепторы, которые (i) активируются клетками, экспрессирующими MAGE-A4, (см. пример 8) и/или (ii) проявляют ингибирование роста опухоли у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты множественной миеломы или меланомы человека.

Получение антигенсвязывающих доменов

[174] Антигенсвязывающие домены антител (включая биспецифические антитела) и химерных антигенных рецепторов настоящего описания, которые специфичны для определенных антигенов (например, MAGE-A4), могут быть получены с помощью любой технологии получения антител, известной в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления один или несколько отдельных компонентов (например, тяжелых и легких цепей) соответствующих антител настоящего описания получены из химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области техники. Например, одну или более тяжелых и/или легких цепей можно получить с использованием технологии VELOCIMMUNE™. Используя технологию VELOCIMMUNE™ (или любую другую технологию получения человеческих антител), первоначально выделяют химерные антитела с высокой аффинностью к определенному антигену (например, MAGE-A4), имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Антитела характеризуются и отбираются по требуемым характеристикам, включая аффинность, нейтрализацию, селективность, эпитоп и т. д. Как обсуждается в настоящем документе, эти переменные области (или CDR) человека затем могут быть включены в антигенсвязывающие домены химерных антигенных рецепторов. В других примерах два различных антигена (например, антитела к MAGE-A4 и к CD3) можно соответствующим образом расположить относительно друг друга для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы настоящего описания (например, антитело, CAR или их антигенсвязывающие фрагменты) стандартными способами. В отдельных вариантах осуществления один или более отдельных компонентов (например, тяжелая и легкая цепи) мультиспецифических антигенсвязывающих молекул настоящего описания получены из химерных, гуманизированных или полностью гуманизированных антител.

Полинуклеотиды и векторы

[175] В настоящем описании также предложены полинуклеотиды и векторы, кодирующие антитела (или их части) и химерные антигенные рецепторы, обсуждаемые в настоящем документе.

[176] В различных вариантах осуществления полинуклеотид может содержать

кассету экспрессии или вектор экспрессии (например, плазмиду для введения в бактериальную клетку-хозяин, или вирусный вектор, такой как бакуловирусный вектор для трансфекции клетки-хозяина насекомого, или плазмиду или вирусный вектор, такой как лентивирус или аденоассоциированный вирус, для трансфекции клетки-хозяина млекопитающего).

[177] В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 21, или включают молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 22. В других вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 104, или включают молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 105. В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 1, или включают молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 83. В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 9, или включают молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 10. В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 17, или включают молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 18. В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 19, или включают молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 20. В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 54, или включают молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 55. В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 62, или включают молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 63. В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 68, или включают молекулу нуклеиновой

кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 69. В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 70, или включают молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 71. В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 72, или включают молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 73. В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 80, или включают молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 81. В отношении вышеупомянутых номеров последовательностей SEQ ID NO в объем этого описания также входит, что полинуклеотиды и/или векторы охватывают любую их подпоследовательность, такую как одну или более HCDR, LCDR и т. п. в различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат последовательность нуклеотидов, кодирующих аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Генно-инженерные методы получения иммунных клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы

[178] В настоящем описании предложены способы получения иммунных клеток для иммунотерапии, включающие введение *ex vivo* в такие иммунные клетки полинуклеотиды или векторы, кодирующие один из MAGE-A4-специфических химерных антигенных рецепторов, описанных в настоящем документе. Такие иммунные клетки могут быть аутологичными или аллогенными.

[179] В настоящем описании предложены иммунные клетки, содержащие полинуклеотид или лентивирусный вектор, кодирующий один из MAGE-A4-специфических химерных антигенных рецепторов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления эти иммунные клетки используются для иммунотерапии (например, лечения злокачественного новообразования).

[180] В настоящем описании предложены способы генетической модификации иммунных клеток для адаптации их к аллогенной трансплантации. Согласно первому аспекту иммунная клетка может быть сделана аллогенной, например, путем инактивации по меньшей мере одного гена, экспрессирующего один или более компонентов Т-клеточного рецептора (TCR), как описано в WO 2013/176915, который можно комбинировать с инактивацией гена, кодирующего или регулирующего экспрессию белка HLA или $\beta 2m$. Соответственно, риск синдрома «трансплантат против хозяина» и отторжения трансплантата значительно снижается. Согласно дополнительному аспекту

настоящего описания, иммунными клетками можно дополнительно манипулировать, чтобы сделать их более активными или ограничить истощение, путем инактивации генов, кодирующих белки, которые действуют как «иммунные контрольные точки», которые действуют как регуляторы активации Т-клеток, такие как PD1 или CTLA-4.

Полученные генно-инженерными методами иммунные клетки

[181] Настоящее описание также относится к иммунным клеткам (например, полученным генно-инженерными методами иммунным клеткам), содержащим химерный антигенный рецептор, как описано в настоящем документе. В некоторых случаях иммунная клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых случаях иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых случаях иммунная клетка представляет собой Т-лимфоцит, выбранный из воспалительного Т-лимфоцита, цитотоксического Т-лимфоцита, регуляторного Т-лимфоцита или Т-хелпера. В некоторых случаях иммунная клетка представляет собой цитотоксический CD8⁺ Т-лимфоцит.

[182] В некоторых вариантах осуществления полученная генно-инженерными методами иммунная клетка представляет собой Т-клетку человека, содержащую химерный антигенный рецептор, содержащий от N-конца к С-концу: (а) внеклеточный лиганд-связывающий домен, содержащий домен вариабельного одноцепочечного фрагмента (scFv) к MAGE-A4, содержащий вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR); (b) шарнир; (c) трансмембранный домен; и (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен и сигнальный домен.

[183] В некоторых вариантах осуществления домен scFv полученной генно-инженерными методами Т-клетки человека содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые содержат аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2/10. В некоторых случаях шарнир содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 27. В некоторых случаях трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 28. В некоторых случаях костимулирующий домен представляет собой костимулирующий домен 4-1BB. В некоторых случаях костимулирующий домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых случаях сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых случаях сигнальный домен CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 30.

[184] В различных вариантах осуществления полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22. В различных вариантах осуществления полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 105.

Биоэквиваленты

[185] В настоящем описании предложены антитела и химерные антигенные рецепторы и полученные генно-инженерными методами клетки, экспрессирующие

химерные антигенные рецепторы, которые имеют аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых иллюстративных молекул, описанных в настоящем документе, но которые сохраняют способность связывать MAGE-A4 (и CD3 в случае биспецифических антител), активировать иммунные клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы, в присутствии клеток, экспрессирующих MAGE-A4, или подавлять рост либо пролиферацию опухолевых клеток, экспрессирующих MAGE-A4. Такие варианты антитела могут содержать одну или большее количество добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна таковой описанных антигенсвязывающих молекул.

[186] В одном варианте осуществления две полученные генно-инженерными методами иммунные клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор настоящего описания, являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и эффективности.

[187] В одном варианте осуществления две полученные генно-инженерными методами иммунные клетки или два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может один или несколько раз быть переведен с референсного продукта на биологический продукт и наоборот без ожидаемого увеличения риска побочных действий, в том числе клинически значимого изменения иммуногенности или уменьшения эффективности, по сравнению с непрерывной терапией без такого перевода.

[188] В одном из вариантов осуществления две полученные генно-инженерными методами иммунные клетки или два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют посредством одного и того же механизма или механизмов действия для условия или условий применения в той мере, в которой такие механизмы известны.

[189] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, скорость и степень абсорбции которых не демонстрируют значимой разницы при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, как в разовой дозе, так и в многократных дозах. Некоторые антигенсвязывающие белки будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и, тем не менее, могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в маркировке, не имеют существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при долгосрочном применении, и считаются с медицинской точки зрения незначительными для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

[190] Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с помощью способов *in*

vivo и *in vitro*. Показатели биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором измеряют концентрацию полученной генно-инженерными методами клетки в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) тест *in vivo*, который коррелирует с *in vivo* данными человека о биодоступности и является обоснованно прогностическим; (c) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект полученной генно-инженерными методами клетки (или ее мишени) измеряют в зависимости от времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое исследование, в котором определяют безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность полученной генно-инженерными методами клетки.

[191] Биоэквивалентные варианты иллюстративных полученных генно-инженерными методами клеток, представленных в настоящем документе, могут быть сконструированы, например, путем внесения различных замен остатков или последовательностей либо удаления концевых или внутренних остатков либо последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности.

[192] Биоэквивалентные варианты иллюстративных антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе, могут быть сконструированы, например, с помощью различных замен остатков или последовательностей либо удаления концевых или внутренних остатков либо последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, цистеиновые остатки, несущественные для биологической активности, могут быть подвергнуты делеции или заменены на другие аминокислоты, чтобы предотвратить образование ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах, биоэквивалентные антигенсвязывающие белки могут включать варианты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, предложенных в настоящем документе, содержащие изменения аминокислот, которые модифицируют характеристики гликозилирования молекул, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Видовая селективность и перекрестная реактивность между видами

[193] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего описания предоставлены антигенсвязывающие домены, которые связываются с MAGE-A4 человека, но не с MAGE-A4 других видов. Также предложены антигенсвязывающие домены к MAGE-A4, которые также связываются с AOX1 человека, но не с AOX1 других видов. Также предложены антигенсвязывающие домены к MAGE-A4, которые также связываются с SHTN1 человека, но не с SHTN1 других видов. В настоящем описании также представлены антигенсвязывающие домены, которые связываются с MAGE-A4 человека и с MAGE-A4 одного или более отличных от человека видов. В настоящем описании также предложены антигенсвязывающие домены к MAGE-A4, которые связываются с AOX1 человека и с AOX1 одного или более отличных от человека видов. В настоящем описании также предложены антигенсвязывающие молекулы к MAGE-A4, которые связываются с

SHTN1 человека, но не с SHTN1 из других видов. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены настоящего описания связываются с MAGE-A4 286-294, а также или с AOX1 795-803 и/или SHTN1 198-206. В некоторых вариантах осуществления MAGE-A4 и/или AOX1 и/или SHTN1, с которым связывается антигенсвязывающий домен (например, MAGE-A4 286-294 или AOX1 795-803 или SHTN1 198-206), представлен на поверхности клетки с помощью HLA, например, HLA-A2.

[194] В соответствии с отдельными иллюстративными вариантами осуществления настоящего описания предложены антигенсвязывающие домены, которые связываются с MAGE-A4 и/или родственными MAGE-A4 пептидами человека, и могут связываться или не связываться, в зависимости от конкретного случая, с одним или более из MAGE-A4 и/или родственными MAGE-A4 пептидами мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванской макаки, мартышки, макаки-резуса или шимпанзе. Кроме того, связывание с MAGE-A4 и/или родственными MAGE-A4 пептидами может происходить в контексте представляемого МНС MAGE-A4 (или родственного MAGE-A4 пептида), такого как представляемого HLA MAGE-A4. Примером представляемого HLA MAGE-A4 является связанный с HLA-A2 MAGE-A4 человека.

Активация и наращивание полученных генно-инженерными методами иммунных клеток

[195] Либо до, либо после генетической модификации полученных генно-инженерными методами клеток (например, Т-клеток), даже если генетически модифицированные иммунные клетки настоящего описания активируются и пролиферируют независимо от антигенсвязывающих механизмов, иммунные клетки, в частности Т-клетки настоящего описания, могут быть дополнительно активированы и наращены в целом с использованием способов, описанных, например, в патентах США № 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; и публикации заявки на патент США № 20060121005. Т-клетки можно наращивать *in vitro* или *in vivo*.

[196] Как правило, Т-клетки настоящего описания можно наращивать путем приведения в контакт с агентом, который стимулирует комплекс CD3 TCR и костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток, чтобы создать сигнал активации для Т-клетки. Например, химические вещества, такие как ионофор кальция А23187, форбол 12-миристанат 13-ацетат (РМА) или митогенные лектины, такие как фитогемагглютинин (РНА), могут использоваться для создания сигнала активации для Т-клетки.

[197] В качестве неограничивающих примеров популяции Т-клеток можно стимулировать *in vitro*, например, путем приведения в контакт с антителом к CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом к CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем приведения в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в комбинации с ионофором кальция. Для костимуляции вспомогательной

молекулы на поверхности Т-клеток используется лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Условия, подходящие для культуры Т-клеток, включают подходящие среды (например, минимальные питательные среды или среды RPMI 1640 или X-vivo 5 (Lonza)), которые могут содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, эмбриональную бычью или человеческую сыворотку), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN-g, 1L-4, 1L-7, GM-CSF, IL-10, IL-2, 1L-15, TGF β , и TNF- α или любые другие добавки для роста клеток известны специалисту в данной области техники. Другие добавки для роста клеток включают, но не ограничиваются ими, сурфактант, плазманат и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среда может включать RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 1, и X-Vivo 20, Optimizer, с добавлением аминокислот, пирувата натрия и витаминов, или без сыворотки, или с добавлением соответствующего количества сыворотки (или плазмы) или определенного набора гормонов и/или количества цитокинов, достаточного для роста и наращивания Т-клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры, а не в культуры клеток, которые должны быть введены субъекту. Целевые клетки поддерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, например, при подходящей температуре (например, 37 °C) и атмосфере (например, воздух плюс 5% O₂). Т-клетки, которые подвергались стимуляции в течение различных периодов времени, могут обладать различными характеристиками.

[198] В некоторых вариантах осуществления клетки можно наращивать путем совместного культивирования с тканью или клетками. Клетки также могут быть наращены *in vivo*, например, в крови субъекта после введения указанной клетки субъекту.

Терапевтический состав и введение

[199] Используемые в настоящем документе термины «эффективное количество» и «терапевтически эффективное количество» относятся к количеству активного терапевтического агента, достаточной для получения желаемого терапевтического ответа без чрезмерных нежелательных побочных эффектов, таких как токсичность, раздражение или аллергическая реакция. Конкретное «эффективное количество» будет очевидно варьироваться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, для которого проводится терапия, физическое состояние пациента, тип получающего терапию животного, продолжительность терапии, природа проводимой параллельно терапии (при ее наличии) и конкретные используемые композиции и структура соединений или их производных. В этом случае количество будет признано терапевтически эффективным, если оно приведет без ограничений к одному или более из следующих результатов: (a) ингибирование роста опухоли (например, злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4); и (b) обращение или стабилизацию злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4.

[200] Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, подлежащего лечению заболевания, состояний, пути введения и тому подобного. Предпочтительную дозу обычно рассчитывают в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. При применении антитела или биспецифической антигенсвязывающей молекулы настоящего изобретения в терапевтических целях у взрослого пациента может быть предпочтительным внутривенное введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы настоящего изобретения обычно в разовой дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частота и продолжительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозировки и режимы введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы могут быть определены эмпирически; например, можно контролировать развитие состояния пациента путем периодической оценки и соответствующим образом корректировать дозу. Кроме того, межвидовое масштабирование дозировок может быть выполнено с использованием хорошо известных в данной области техники способов (например, Mordenti et al., 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

[201] Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредуемый рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Способы введения включают, без ограничений, внутридермальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный способ введения. Композиция может быть введена любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистокожные покровы (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т. д.), и может быть введена вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным.

[202] Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в случае подкожного введения при доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению весьма подходящим является шприц-ручка. Такая шприц-ручка может быть многоразовой или одноразовой. В многоразовой шприц-ручке обычно используется сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После введения всей фармацевтической композиции из картриджа и его опустошения пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручка может быть использована повторно. В одноразовой шприц-ручке нет сменного картриджа. Напротив, одноразовая шприц-ручка

приходит уже заполненной фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После освобождения резервуара от фармацевтической композиции устройство выбрасывают целиком.

[203] Множество многоразовых шприцев-ручек и шприцев-тюбиков подходит для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры включают, не ограничиваясь перечисленным, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., г. Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, г. Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., г. Индианаполис, штат Индиана, США), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, г. Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, г. Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, г. Франклин Лейкс, штат Нью-Джерси, США), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, г. Франкфурт, Германия), и другие. Примеры одноразовых шприц-ручек, которые могут применяться для подкожного введения фармацевтической композиции настоящего изобретения, включают, без ограничений, шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, г. Таузанд-Оукс, штат Калифорния, США), шприц-ручку PENLET™ (Haselmeier, г. Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и HUMIRA™ (Abbott Labs, г. Абботт Парк, штат Иллинойс, США), а также другие.

[204] В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления может использоваться насос (см. Langer выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте осуществления могут быть использованы полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., г. Бока-Ратон, штат Флорида, США. В еще одном варианте осуществления изобретения, система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени композиции, что требует только доли системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением рассмотрены в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

[205] Инъекционные формы могут включать дозированные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных вливаний и т. п. Эти инъекционные формы могут быть получены с помощью общеизвестных способов.

[206] Предпочтительно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в лекарственных формах в единичной дозе, выбранной таким образом, чтобы она вмещала дозу активных ингредиентов. К таким дозированным формам в однократной дозе относятся, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т. д. Количество упомянутого выше антитела, как правило, составляет от примерно 5 до примерно 500 мг на

дозированную форму в единичной дозе; особенно в форме инъекции предпочтительно, чтобы вышеупомянутое антитело содержалось в количестве от примерно 5 до примерно 100 мг и от примерно 10 до примерно 250 мг для других дозированных форм.

[207] Введение клеток или популяции клеток согласно настоящему описанию может осуществляться любым удобным способом, включая ингаляцию аэрозолем, инъекцию, пероральное поступление, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Описанные в настоящем документе композиции можно вводить пациенту подкожно, внутривенно, внутримышечно, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной или внутривенной инъекции или внутривенно. В одном варианте осуществления клеточные композиции настоящего описания предпочтительно вводят внутривенной инъекцией.

[208] Введение клеток или популяции клеток может состоять из введения 10^4 - 10^9 клеток на кг массы тела, предпочтительно от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целые значения числа клеток в этих диапазонах. Клетки или популяция клеток можно вводить в одной или более дозах. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество клеток вводят в виде разовой дозы. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество клеток вводят в виде более чем одной дозы в течение определенного периода времени. Время введения определяется лечащим врачом и зависит от клинического состояния пациента. Клетки или популяция клеток могут быть получены из любого источника, такого как банк крови или донор. Хотя индивидуальные потребности меняются, определение диапазонов эффективных количеств клеток данного типа для конкретного заболевания или патологического состояния находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Эффективное количество означает количество, которое обеспечивает терапевтический или профилактический эффект. Вводимая доза будет зависеть от возраста, состояния здоровья и массы реципиента, вида сопутствующего лечения, если таковое имеется, частоты лечения и характера желаемого эффекта.

[209] В одном варианте осуществления эффективное количество клеток или композиции, содержащей эти клетки, вводят парентерально. Это введение может представлять собой внутривенное введение. В некоторых случаях введение может осуществляться непосредственно путем инъекции внутрь опухоли.

[210] В некоторых вариантах осуществления настоящего описания клетки вводят пациенту в сочетании (например, до, одновременно или после) с любым количеством подходящих способов лечения, включая, помимо прочего, лечение такими агентами, как противовирусная терапия, лечение цидофовиром и интерлейкином-2, цитарабином (также известным как ARA-C) или натализумабом для пациентов с рассеянным склерозом, или лечение эфализумабом для пациентов с псориазом, или другие виды лечения для пациентов с ПМЛ. В дополнительных вариантах осуществления Т-клетки согласно настоящему описанию можно использовать в комбинации с химиотерапией, облучением, иммунодепрессантами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и

FK506, антителами или другими иммуноаблативными средствами, такими как CAMPATH, антитела к CD3 или другие терапевтические средства на основе антител, цитоксин, флударибин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микоплиеноловая кислота, стероиды, FR901228, цитокины, и радиоактивным излучением.

[211] В дополнительном варианте осуществления композиции клеток настоящего описания вводят пациенту в сочетании с (например, до, одновременно или после) трансплантацией костного мозга, абляционной терапией Т-клеток с использованием химиотерапевтических агентов, таких как флударабин, наружная дистанционная лучевая терапия (XRT), циклофосфамид или антитела, такие как ОКТ3 или CAMPATH. В еще одном варианте осуществления клеточные композиции настоящего описания вводят после абляционной терапии В-клеток, такой как агенты, которые реагируют с CD20, например, ритуксан. Например, в одном варианте осуществления субъекты могут проходить стандартное лечение с применением высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых вариантах осуществления после трансплантации субъекты получают инфузию наращенных иммунных клеток согласно настоящему описанию. В дополнительном варианте осуществления наращенные клетки вводят до операции или после нее. В некоторых вариантах осуществления любые средства (например, хирургическое вмешательство, химиотерапия или лучевая терапия) могут использоваться для уменьшения опухолевой нагрузки до введения наращенных иммунных клеток согласно настоящему описанию. В одном варианте осуществления уменьшение опухолевой нагрузки перед введением полученных генно-инженерными методами клеток согласно настоящему описанию может снизить вероятность или предотвратить синдром высвобождения цитокинов или цитокиновый шторм, побочный эффект, который может быть связан с терапией CAR Т-клетками.

Терапевтическое применение

[212] В настоящем описании предложены композиции, содержащие полученную генно-инженерными методами клетку (например, Т-клетку), экспрессирующую химерный антигенный рецептор настоящего описания, и фармацевтически приемлемый носитель. В настоящем описании также предложены композиции, содержащие антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых случаях полученные генно-инженерными методами клетки, антитела или антигенсвязывающие фрагменты образуют лекарственный препарат, особенно для иммунотерапии. В некоторых случаях полученные генно-инженерными методами клетки, антитела или антигенсвязывающие фрагменты используются для лечения злокачественного новообразования (например, множественной миеломы или меланомы). В некоторых случаях полученные генно-инженерными методами клетки, антитела или антигенсвязывающие фрагменты используются в производстве лекарственного препарата для иммунотерапии и/или лечения злокачественного новообразования (например, злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4).

[213] В настоящем описании предложены способы, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, содержащей антитело (например, биспецифическое антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент и/или полученную генно-инженерными методами клетку (например, Т-клетку), экспрессирующую химерный антигенный рецептор, описанный в настоящем документе. Терапевтическая композиция может содержать клетку, экспрессирующую любой химерный антигенный рецептор, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель. В дополнительных или альтернативных примерах терапевтическая композиция содержит антитело и/или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе. Используемое в настоящем документе выражение «субъект, нуждающийся в этом» означает человека или животное, отличное от человека, у которого проявляются один или более симптомов либо признаков злокачественного новообразования (например, субъект с опухолью, экспрессирующей MAGE-A4, или страдающий каким-либо из злокачественных новообразований, упомянутых в настоящем документе), или которым иным образом было бы полезно ингибирование или снижение активности MAGE-A4 или истощение MAGE-A4+ клеток.

[214] Полученные генно-инженерными методами клетки, антитела или антигенсвязывающие фрагменты настоящего описания могут использоваться, среди прочего, для лечения любого заболевания или расстройства, при котором стимуляция, активация и/или нацеливание иммунного ответа были бы полезными. В частности, полученные генно-инженерными методами клетки, антитела или антигенсвязывающие фрагменты настоящего описания можно использовать для лечения, профилактики и/или облегчения любого заболевания или расстройства, связанного или опосредованного экспрессией либо активностью MAGE-A4 или пролиферацией MAGE-A4+ клеток. Клетки, экспрессирующие MAGE-A4, которые можно ингибировать или уничтожить с использованием полученных генно-инженерными методами клеток и/или антител или антигенсвязывающих фрагментов настоящего описания, включают, например, клетки множественной миеломы, клетки меланомы или другие клетки солидных опухолей.

[215] Полученные генно-инженерными методами клетки и/или антитела либо антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему описанию можно использовать для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией MAGE-A4, включая, например, злокачественное новообразование, включая, помимо прочего, множественную миелому, синовиальную саркому, рак пищевода, рак головы и шеи, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак матки, рак желудка, рак шейки матки, рак молочной железы и меланому. Полученные генно-инженерными методами клетки и/или антитела либо антигенсвязывающие фрагменты настоящего описания, как правило, можно использовать для лечения опухоли, экспрессирующей MAGE-A4. В соответствии с другими родственными вариантами осуществления настоящего описания предложены способы, включающие введение полученной генно-инженерными методами клетки и/или антитела

либо антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе, пациенту, имеющему опухоль, экспрессирующую MAGE-A4, включая опухоли из приведенного ниже перечня злокачественных новообразований. Аналитические/диагностические способы, известные в данной области техники, такие как сканирование опухоли и т. д., могут быть использованы для установления наличия у пациента такой опухоли, заболевания или патологического состояния.

[216] Настоящее описание также обеспечивает способы лечения остаточной опухоли у субъекта. В настоящем документе термин «остаточный рак» означает наличие или сохранение одной либо более злокачественных клеток у субъекта после проведения противораковой терапии.

[217] В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем описании предложены способы лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией MAGE-A4 (например, злокачественного новообразования), включающие введение субъекту популяции полученных генно-инженерными методами клеток и/или антител либо антигенсвязывающих фрагментов описанных в других разделах данного документа, после того, как у субъекта было установлено наличие заболевания или расстройства. Например, настоящее описание обеспечивает способы лечения заболевания или расстройства, включающие введение полученных генно-инженерными методами иммунных клеток пациенту через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или более после того, как субъект получил другую иммунотерапию или химиотерапию.

[218] Обсуждаемые в настоящем документе способы лечения могут быть уменьшающими интенсивность заболевания, лечебными или профилактическими. Способ лечения может быть либо частью аутологичной иммунотерапии, либо частью аллогенной иммунотерапии. Под аутологичными подразумевается, что клетки, линия клеток или популяция клеток, используемые для лечения пациентов, получены от пациента или от донора, совместимого с человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA). Под аллогенными подразумевается, что клетки, линия клеток или популяция клеток, используемые для лечения пациентов, получены не от пациента, а от донора.

[219] В настоящем документе описаны клетки, которые можно использовать с раскрытыми в настоящем документе способами. Лечение можно использовать для лечения пациентов, у которых диагностировано предзлокачественное или злокачественное онкологическое состояние, характеризующееся наличием клеток, экспрессирующих MAGE-A4, особенно избытком клеток, экспрессирующих MAGE-A4. Такие патологические состояния можно обнаружить при злокачественном новообразовании.

[220] Типы злокачественных новообразований, подлежащих лечению с помощью полученных генно-инженерными методами клеток, антитела или антигенсвязывающих фрагментов настоящего описания, включают, без ограничений, множественную миелому, синовиальную саркому, рак пищевода, рак головы и шеи, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак матки, рак желудка, рак шейки матки, рак молочной железы и меланому.

[221] Композиции и способы настоящего описания могут использоваться для лечения субъекта, который был охарактеризован как имеющий клетки или ткани, экспрессирующие MAGE-A4, или подозреваемый в наличии клеток или тканей, экспрессирующих MAGE-A4. Например, субъекты, получающие пользу от лечения согласно настоящему описанию, включают субъектов с множественной миеломой, синовиальной саркомой, раком пищевода, раком головы и шеи, раком легкого, раком мочевого пузыря, раком яичников, раком матки, раком желудка, раком шейки матки, раком молочной железы или меланомой.

Комбинированные виды терапии

[222] В настоящем описании предложены способы, которые включают введение, без ограничений, антител/антигенсвязывающих фрагментов (например, биспецифических антител) и/или полученных генно-инженерными методами клеток или популяции клеток, содержащих любой из химерных антигенных рецепторов, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами. Примеры дополнительных терапевтических агентов, которые можно комбинировать или вводить в комбинации с антителами/антигенсвязывающими фрагментами и/или клетками либо популяцией клеток настоящего описания, включают, например, противоопухолевый агент (например, химиотерапевтические агенты, включая мелфалан, винкристин (Oncovin), циклофосфамид (Cytosan), этопозид (VP-16), доксорубин (адриамицин), липосомальный доксорубин (Doxil), обендамустин (Treanda) или любые другие препараты, которые, как известно, эффективны при лечении опухоли из плазматических клеток у субъекта). В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент содержит стероиды. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент содержит средства таргетной терапии, включая талидомид, леналидомид и бортезомиб, которые являются препаратами, одобренными для лечения вновь диагностированных пациентов. Например, леналидомид, помалидомид, бортезомиб, карфилзомиб, панобиностат, иксазомиб, элутузумаб и даратумумаб являются примерами второго терапевтического агента, эффективного для лечения рецидивирующей миеломы. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент относится к схеме, включающей в себя лучевую терапию или трансплантацию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент может представлять собой иммуномодулирующий агент. В отдельных вариантах осуществления второй терапевтический агент может представлять собой ингибитор протеасом, включая бортезомиб (Velcade®), карфилзомиб (Kyprolis®), иксазомиб (Ninlaro®). В отдельных вариантах осуществления второй терапевтический агент может представлять собой ингибитор гистондеацетилазы, такой как панобиностат (Farydak®). В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент может представлять собой моноклональное антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифическое антитело, которое может быть или не быть конъюгировано с противоопухолевым агентом, ингибитор контрольной точки, или их комбинации. Другие агенты, которые можно с пользой вводить

в комбинации с антигенсвязывающими молекулами согласно настоящему описанию, включают в себя ингибиторы цитокинов, включая в себя ингибиторы цитокинов-малых молекул и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, или к их соответствующим рецепторам. Фармацевтические композиции настоящего описания (например, фармацевтические композиции, содержащие полученные генно-инженерными методами клетки или популяции клеток, как описано в настоящем документе) также могут быть введены в качестве части схемы лечения, включающей одну или более терапевтических комбинаций, выбранных из моноклонального антитела, отличного от описанных в настоящем документе, которое может взаимодействовать с другим антигеном на поверхности плазматических клеток, биспецифического антитела, имеющего одно плечо, которое связывается с антигеном на поверхности опухолевых клеток, и другое плечо, которое связывается с антигеном на Т-клетке, конъюгата антитело-лекарственное средство, биспецифического антитела, конъюгированного с противоопухолевым агентом, ингибитора контрольных точек, например, нацеленного на PD-1 или CTLA-4, или их комбинаций. В отдельных вариантах осуществления ингибиторы контрольных точек могут быть выбраны из ингибиторов PD-1, таких как пембролизумаб (Keytruda®), ниволумаб (Opdivo®) или цемиплимаб (Libtayo®). В отдельных вариантах осуществления ингибиторы контрольных точек могут быть выбраны из ингибиторов PD-L1, таких как атезолизумаб (Tecentriq®), авелумаб (Bavencio®) или дурвалумаб (Imfinzi®). В отдельных вариантах осуществления ингибиторы контрольных точек могут быть выбраны из ингибиторов CTLA-4, таких как ипилимумаб (Yervoy®).

[223] Настоящее описание также включает терапевтические комбинации, содержащие любые из антител/антигенсвязывающих фрагментов и/или полученных генно-инженерными методами клеток либо популяций клеток, упомянутых в настоящем документе, и ингибитор одного или более из VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, уроплакина или любого из вышеупомянутых цитокинов, причем ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, миРНК, пептидное антитело, наноантитело или фрагмент антитела (например, фрагмент Fab; фрагмент F(ab')₂; Fd-фрагмент; фрагмент Fv; scFv; фрагмент dAb; или другие полученные генно-инженерными методами молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела, минитела и минимальные распознающие единицы). В некоторых вариантах осуществления антитела/антигенсвязывающие фрагменты, полученные генно-инженерными методами клетки или популяцию клеток настоящего описания также можно вводить в качестве схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или традиционную химиотерапию.

[224] Дополнительный терапевтически активный компонент(компоненты) можно вводить непосредственно перед, одновременно или вскоре после введения полученных генно-инженерными методами клеток по настоящему описанию; (для целей настоящего

описания такие схемы введения считаются введением полученных генно-инженерными методами клеток «в комбинации» с дополнительным терапевтически активным компонентом).

[225] Настоящее описание относится к фармацевтическим композициям, в которых полученная генно-инженерными методами клетка или популяция клеток настоящего описания объединены в состав с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в другом месте настоящего документа.

Схемы введения

[226] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего описания субъекту можно вводить несколько доз антител/антигенсвязывающих фрагментов и/или полученных генно-инженерными методами клеток в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту включают последовательное введение субъекту множества доз антигенсвязывающих молекул и/или клеток. В контексте данного документа, «последовательное введение» подразумевает то, что каждую дозу вводят субъекту в другой момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). В настоящем описании предложены способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы, за которой следует одна или более вторичных доз и, необязательно, следует одна или более третичных доз.

[227] Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения антигенсвязывающих молекул и/или полученных генно-инженерными методами клеток согласно настоящему описанию. Таким образом, «начальная доза» представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (ее также называют «исходной дозой»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество антигенсвязывающих молекул и/или полученных генно-инженерными методами клеток, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Согласно определенным вариантам осуществления, однако, количество антигенсвязывающих молекул и/или полученных генно-инженерными методами клеток, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (например, корректируется в большую или меньшую сторону по мере необходимости) в течение курса лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводятся в начале схемы лечения в виде «нагрузочных доз», за которыми следуют последующие дозы, которые вводятся реже (например, «поддерживающие дозы»).

[228] В одном типичном варианте осуществления настоящего описания каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, через 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно

предшествующая доза» в контексте данного документа означает, в последовательности многократных введений, дозу, которую вводят пациенту до введения непосредственно следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

[229] Способы в соответствии с этим аспектом настоящего описания могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз. Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичные дозы. Аналогичным образом, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичные дозы.

[230] В вариантах осуществления, включающих многократные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может быть введена пациенту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом в вариантах осуществления, включающих введение множества третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-4 недель после непосредственно предшествующей дозы. В качестве альтернативы, частота, с которой пациенту вводят вторичные и/или третичные дозы, может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения также может корректироваться лечащим врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

ПРИМЕРЫ

[231] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как получать и применять способы и композиции настоящего описания, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают созданным ими изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т. д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой весовые части, молекулярная масса представляет собой среднечисленную молекулярную массу, температура указана в градусах Цельсия, а давление находится на уровне или около атмосферного.

Пример 1. Получение антител к MAGE-A4

[232] Антитела к MAGE-A4 получали путем иммунизации генетически модифицированной мыши (например, полученной генно-инженерными методами мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека) антигеном MAGE-A4 человека (например, hMAGE-A4 286-294 для mAb31339N2) и HLA-A2 (HLA-A*02:01). Более конкретно, геном генетически модифицированной мыши имел нуклеотидную последовательность, кодирующую HLA-A2 человека (а также последовательности, кодирующие переменные области тяжелой цепи и

легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека), так что генетически модифицированная мышь экспрессировала HLA-A2 человека, причем мышь была толерантной к HLA-A2 человека так что генерировался специфический В-клеточный ответ при иммунизации антигеном MAGE-A4 и HLA-A2.

[233] После иммунизации у каждой мыши отбирали спленциты и либо (1) сливали с клетками мышинной миеломы для сохранения их жизнеспособности и образования гибридомных клеток и подвергали скринингу на специфичность к MAGE-A4, либо (2) сортировали В-клетки (как описано в публикации патента США № 2007/0280945A1) с использованием фрагмента MAGE-A4 человека в качестве реагента для сортировки, который связывает и идентифицирует реактивные антитела (антиген-положительные В-клетки).

[234] Сначала выделили химерные антитела к MAGE-A4, имеющие переменную область человека и константную область мыши. Антитела были охарактеризованы и отобраны по желаемым характеристикам, включая аффинность, селективность и т. д. В некоторых примерах константные области мыши заменяли желаемой константной областью человека, например, константной областью IgG1 или IgG4 дикого либо модифицированного типа, для создания полностью человеческого антитела к MAGE-A4 (например, mAbM31339N2 (содержащее константную область мыши) использовали для получения mAbH31339N2 (содержащего константную область человека)). В то время как выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики связывания антигена с высокой аффинностью и специфичностью в отношении мишени находятся в переменной области.

[235] mAbM31339N2 также переформатировали в биспецифические антитела с использованием либо высокоаффинного плеча к CD3 (7195P) с получением bsAb6054 (HCVR1, LCVR1 и LCVR2 из mAb31339 и HCVR2 из 7195P) или среднеаффинного плеча к CD3 (7221G) с получением bsAb6043 (HCVR1, LCVR1 и LCVR2 из mAb31339 и HCVR2 из 7221G).

[236] *Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей антител к MAGE-A4.* В таблице 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR отобранных антител к MAGE-A4 согласно настоящему описанию. Последовательности mAb31339N и mAb31339N2 из таблицы 1 являются идентичными, за исключением различия одной аминокислоты в каркасной области 3 в HCVR; однако CDR у mAb31339N и mAb31339N2 являются одинаковыми. Соответствующие идентификаторы нуклеотидных последовательностей представлены в таблице 2. Краткое описание всех последовательностей, включенных в данный документ, представлена в таблице 15.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

	SEQ ID NO:
--	------------

Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb31339N	83	4	6	8	10	12	14	16
mAbM31339 N2	2	4	6	8	10	12	14	16
mAbH31339 N2	2	4	6	8	10	12	14	16
mAbM34852 N	107	109	111	113	115	117	14	119

Таблица 2. Идентификаторы нуклеотидных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAbM31339 N	82	3	5	7	9	11	13	15
mAbM31339 N2	1	3	5	7	9	11	13	15
mAbH31339 N2	1	3	5	7	9	11	13	15
mAbM34852 N	106	108	110	112	114	116	13	118

[237] *Получение биспецифических антител, связывающих CD3 и MAGE-A4.*

Биспецифические антитела, содержащие CD3-специфический связывающий домен и MAGE-A4-специфический связывающий домен конструировали с последовательностями, перечисленными в таблице 3 и таблице 4, с использованием методик, в которых тяжелую цепь из антитела к CD3 объединяли с тяжелой цепью и родственной легкой цепью из антитела к MAGE-A4.

[238] Соответственно, биспецифические антитела, созданные в соответствии с настоящим примером, содержат два отдельных антигенсвязывающих домена (т. е. связывающих плеча). Первый антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, полученную из антитела к MAGE-A4 («MAGE-A4-VH»), спаренную с родственной вариабельной областью легкой цепи, полученной из антитела к MAGE-A4 («MAGE-A4-VL»), а второй антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, полученную из антитела к CD3 («CD3-VH»), спаренную с MAGE-A4-VL. В принципе, также можно использовать родственную вариабельную область легкой цепи из антитела к CD3 («CD3-VL») в качестве вариабельной области легкой цепи, общей для обоих

плеч антитела. Одну и ту же область MAGE-A4-VH использовали во всех биспецифических антителах, созданных в данном примере. Антитело bsAb6054 содержит связывающее MAGE-A4 плечо, содержащее HCVR/LCVR из SEQ ID NO: 2/10, и связывающее CD3 плечо, содержащее HCVR/LCVR из SEQ ID NO: 73/10. Антитело bsAb6043 содержит связывающее MAGE-A4 плечо, содержащее HCVR/LCVR из SEQ ID NO: 2/10, и связывающее CD3 плечо, содержащее HCVR/LCVR из SEQ ID NO: 55/10.

[239] Идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и CDR, используемых для конструирования антигенсвязывающего плеча к CD3 и связывающего плеча к MAGE-A4, приведены в таблице 3. Соответствующие идентификаторы нуклеотидных последовательностей представлены в таблице 4. Биспецифические антитела к MAGE/CD3 получали либо из среднеаффинного антитела к CD3 (антитело к CD3-A; в настоящем документе именуется H4sH7221G или 7221G), либо из высокоаффинного антитела к CD3 (антитело к CD3-B; в настоящем документе именуется HpH4sH7195P или 7195P). Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен в настоящем документе называются «плечами» биспецифического антитела. В этих примерах одно плечо содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10; а другое плечо содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 73, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10.

Таблица 3. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAbM31339N2	2	4	6	8	10	12	14	16
Антитело к CD3-A	55	57	59	61	63	65	14	67
Антитело к CD3-B	73	75	77	79	63	65	14	67

Таблица 4. Идентификаторы нуклеотидных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAbM31339N2	1	3	5	7	9	11	13	15
Антитело к CD3-A	54	56	58	60	62	64	13	66
Антитело к CD3-B	72	74	76	78	62	64	13	66

CD3-B								
-------	--	--	--	--	--	--	--	--

Пример 2. Связывание антитела к HLA-A2:MAGE-A4 (286-294) с T2-клетками с добавлением MAGE-A4 (286-294) по данным проточной цитометрии

[240] Связывание поверхности клетки антитела к HLA-A2:MAGE-A4 286-294 (mAbM31339N) с HLA-A*02:01-положительными T2-клетками (174 СЕМ.Т2) оценивали методом проточной цитометрии в анализе с добавлением пептида. Для добавления пептида 1×10^6 клеток T2 инкубировали с 10 мкг/мл В2М человека (h) (EMD Millipore кат. № 475828) и 100 мкг/мл пептида MAGE-A4 286-294 в 1 мл среды AIM V (Gibco, кат. № 31035-025) в течение 16 ч при 37 °С. Клетки промывали в буфере для окрашивания ((PBS без кальция и магния (Corning, кат.№ 21-031-CV) 2% FBS (Seradigm, № партии 238B15)), собирали с использованием буфера для диссоциации клеток (Millipore, кат. № S-004-C) и ресуспендировали в буфере для окрашивания. Клетки после добавления (200 000) высевали на 96-луночные планшеты с V-образным дном (Axygen, кат. № P-96-450V-C-S) и окрашивали трехкратными последовательными разведениями (1,7 пМ - 100 нМ) mAbM31339N или несвязывающимся контрольным антителом (mAb1097) в течение 30 мин при 4 °С. Затем клетки промывали один раз в буфере для окрашивания и инкубировали с конъюгированным с Alexa Fluor 647 вторичным специфическим к Fc мыши антителом Fab'2 (Jackson ImmunoResearch, кат. № 115-606-071) в концентрации 5 мкг/мл в течение 30 мин при 4 °С. Наконец, клетки окрашивали зеленым флуоресцентным красителем на жизнеспособность (Molecular Probes, кат. № L-34970, разведенным в 50 мкл DMSO) в концентрации 1 : 1000. Затем клетки промывали и фиксировали с использованием 50% раствора BD Cytotfix (BD, кат. № 554655), разведенного в PBS. Образцы обрабатывали на проточном цитометре Intellicyt iQue (Intellicyt) и результаты анализировали с использованием программного обеспечения для анализа Forecyte (Intellicyte), рассчитывая среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) после гейтирования живых клеток. По значениям MFI строили график в GraphPad Prism, используя четырехпараметрическое логистическое уравнение по 12-точечной кривой зависимости для расчета значений EC₅₀. Также в анализ включают только вторичное антитело (т. е. без первичного антитела) для каждой кривой зависимости в качестве продолжения трехкратного последовательного разведения, и эти данные представлены как наименьшая доза. Соотношение сигнал/шум (S/N) определяли по отношению наибольшего MFI на кривой зависимости к MFI лунок, содержащих только вторичное антитело. Значения EC₅₀ (M) и макс. Отношения сигнал/шум (S/N) показаны в таблице 5. mAbM31339N связывалось с EC₅₀, равным 1,7 нМ и макс. S/N 1933, тогда как связывание контрольного антитела (mAb1097) не обнаруживалось, и это указывает на то, что mAb31339N обладает высокой аффинностью связывания с MAGE-A4 (286-294). В таблице 5 обозначение Н/О показывает значения EC₅₀, которые невозможно точно определить, поскольку связывание не достигло насыщения в тестируемом диапазоне концентраций антитела.

Таблица 5. Связывание антитела к HLA-A2:MAGE-A4 (286-294) с клетками T2, представляющими MAGE-A4 (286-294)

мАт	EC50	Макс. S/N
mAbM31339N	1,7E-09	1933
mAb1097 (изотипический контроль mIgG2a)	H/O	1

Пример 3. Связывание антитела к HLA-A2:MAGE-A4 и биспецифических антител к MAGE-A4 × CD3 с клетками T2 с добавлением пептидов, родственных MAGE-A4

[241] С помощью вычислительной стратегии компьютерного моделирования (Dhanik A et. al. BMC Bioinformatics 2016) было идентифицировано несколько пептидов, родственных MAGE-A4, по прогнозу образующих комплекс с HLA-A*02:01. Идентифицированные пептиды сведены в таблицу 6.

Таблица 6. Последовательности пептидов MAGE-A4 286-294 и спрогнозированных не являющихся мишенями пептидов

Пептид (название гена и местоположение пептида)	Пептидная последовательность	SEQ ID NO
MAGE-A4 286-294	KVLEHVVRV	33
FN1 2182-2190	KVREEVTV	40
AOX1 795-803	KVMCHVRRV	41
PSME2 145-153	KVLERVNAV	42
PCDHGC3 337-345	KVLVEVVDV	43
SHTN1 198-206	KVLEKCNRV	44
SMIM11A 4-12	KVLEHVPLL	45
RABGAP1L 408-416	FLLETVVRV	46
CNOT1 1965-1973	KVLGIVGV	47
CARD8 170-178	MVLEHPARV	48
MRPL37 334-342	KVLEQPVVV	49
PLEKH2 790-798	KVLQNVLRV	50
NBAS 2063-2071	KVLEGVVAA	51
TEP1 2156-2164	AVEEHVVSV	52
HEATR5A 1925-1933	KVLETLVTV	53

[242] Связывание исходного антитела (mAbH31339N2), биспецифического антитела к MAGE-A4 × CD3 (7221G) (bsAb6043) и несвязывающегося изотипического контрольного антитела (mAb4241) с этими родственными пептидами, показанными в таблице 6, оценивали в анализе с добавкой к клеткам T2, как описано выше. Как отмечено выше в

примере 1, антитело bsAb6043 содержит связывающее MAGE-A4 плечо, содержащее HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 2/10, и связывающее CD3 плечо, содержащее HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 55/10. Как показано в таблице 7, оба антитела связывались с пептидом MAGE-A4 с значениями S/N 310 для mAbH31339N2 и 244 для bsAb6043, что существенно выше исходного уровня (без пептида). Испытанные антитела продемонстрировали более низкое связывание с AOX1 со значениями S/N 131 для mAbH31339N2 и 110 для bsAb6043, и с SHTN1 со значениями S/N 5 для обоих антител. Не наблюдали обнаруживаемого связывания с остальными пептидами, а связывание контрольного антитела составляло ≤ 3 для всех протестированных пептидов.

Таблица 7. Связывание антитела к HLA-A2:MAGE-A4 (286-294) с клетками T2, представляющими пептиды, родственные MAGE-A4

Пептид (название гена и местоположение пептида)	Антитело		
	mAbH31339N2 (соотношение S/N)	bsAb6043 (соотношение S/N)	mAb4241 (соотношение S/N)
Без пептида	1	1	3
MAGE-A4 (286-294)	310	244	3
FN1 (2182-2190)	1	1	3
AOX1 (795-803)	131	110	3
PSME2 (145-153)	1	1	3
PCDHGC3 (337-345)	1	1	3
SHTN1 (198-206)	5	5	3
SMIM11A (4-12)	1	1	3
RABGAP1L (408-416)	1	1	3
CNOT1 (1965-1973)	1	1	3
CARD8 (170-178)	1	1	2
MRPL37 (334-342)	1	1	3
PLEKH2 (790-798)	1	1	2
NBAS (2063-2071)	1	1	3
TEP1 (2156-2164)	1	1	3
HEATR5A (1925-1933)	1	1	3

Пример 4. Оценка активности биспецифических антител к MAGE-A4 × CD3 в

биоанализе с Т-клеточным репортером/антигенпредставляющей клеткой (АПК)

[243] Активность биспецифических антител к MAGE-A4 × CD3 оценивали в биоанализе с Т-клеточным репортером/антигенпредставляющей клеткой (АПК). Для получения линии клеток для анализа, клетки Jurkat трансдуцировали с помощью NF-κB-зависимого люциферазного репортерного лентивирусного вектора (Qiagen) и выполняли сортировку индивидуальных клеток на высокую люциферазную активность для получения аналитической клеточной линии Jurkat/NF-κBLuc. Клетки IM9 и U266B1, которые представляют собой линии клеток миеломы, эндогенно экспрессирующие MAGE-A4 и HLA-A*02:01, использовали в качестве антигенпредставляющих клеток (АПК). Кроме того, в качестве контроля использовали клетки Raji, которые являются негативными по MAGE-A4 и HLA-A2. Если коротко, по 25 000 клеток Jurkat/NF-κBLuc добавляли в лунки 96-луночных планшетов Thermo-Nunc (Thermo Scientific, кат. № 136101) в 25 мкл среды для анализа (среда RPMI с 10% FBS и 1% P/S/G), после чего добавляли по 25 000 АПК в 25 мкл среды для анализа. На планшет наносили 3-кратные последовательные разведения антитела от 27,4 пМ - 20 нМ в 50 мкл среды для анализа. Смеси клеток инкубировали в инкубаторе с контролем влажности при 37°C, 5% CO₂ в течение 5 часов. Активность NF-κB-люциферазы определяли с использованием Promega One-Glo (кат. № E6130) и сканера для планшетов Perkin Elmer Envision. Получали относительные единицы люциферазы (RLU), и значения EC50 определяли с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 8-точечной кривой зависимости (GraphPad Prism). Также в анализ включали условие отсутствия первичного антитела (только вторичное антитело) для каждой кривой зависимости в виде продолжения трехкратного последовательного разведения, и оно представлено как наименьшая доза. Максимальную активность определяли, взяв отношение самого высокого RLU на кривой к самому низкому, и оно представлено как соотношение сигнал/шум (S/N). Значения EC50 и S/N приведены в таблице 8. В таблице 8 обозначения Н/О показывают значения EC50, которые не могут быть точно определены, поскольку связывание не достигло насыщения в тестируемом диапазоне концентраций антитела.

Таблица 8. Активность биспецифических антител MAGE-A4 × CD3 в репортерном биоанализе с Jurkat/NF-κB-Luc/АПК

Антитело			Jurkat/NF-κB Luc cl.1C22+IM-9		Jurkat/NF-κB Luc cl.1C22+U266		Jurkat/ NF-κB Luc cl.1C22+RAJI	
			EC50 (нМ)	Крат- ность актив- ации	EC50 (нМ)	Крат- ность актива- ции	EC50 0 (нМ)	Крат- ность актива- ции
bsAb6043	mAb31339N 2	mAb722 1G	Н/О	1,8	Н/О	0,9	Н/О	0,8

bsAb6054	mAb31339N 2	mAb719 5P	7,40E- 10	41,9	3,10E -09	6,3	H/O	0,9
bsAb4241	mAb8767P2	mAb722 1G	H/O	1,1	H/O	1,1	H/O	0,9
bsAb3905	mAb17363N	mAb719 5P	H/O	2,2	H/O	1,2	H/O	0,9

[244] Как отмечено в примере 1, антитело bsAb6054 содержит связывающее MAGE-A4 плечо, содержащее HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 2/10, и связывающее CD3 плечо, содержащее HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 73/10, а антитело bsAb6043 содержит связывающее MAGE-A4 плечо, содержащее HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 2/10 и связывающее CD3 плечо, содержащее HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 55/10. Антитела bsAb4241 и bsAb3905 являются несвязывающимися (с MAGE-A4) контролями со связывающимися с CD3 плечами, содержащими ту же HCVR антитела к CD3, что и bsAb6043 и bsAb6054 соответственно, спаренную с родственной вариабельной областью легкой цепи из не связывающегося с MAGE-A4 плеча каждого соответствующего антитела.

[245] Как показано в таблице 8, среднеаффинное биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 (bsAb6043) не обладает активностью в биоанализе Jurkat/NF-κB-Luc в присутствии клеток IM9, U266B1 или RAJI. Напротив, высокоаффинное биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 (bsAb6054) имело значения EC50 7,4E-10M и 3,1E-09M и значения S/N 41,9 и 6,3 на клетках IM9 и U266B1 соответственно. Несвязывающиеся контрольные биспецифические антитела со среднеаффинным плечом к CD3 (mAb4241) или высокоаффинным плечом к CD3 (mAb3905) имели минимальную активность, со значениями S/N ≤ 2,2. Кроме того, ни одно из антител не обладало активностью на клетках RAJI.

[246] Провели сходный биоанализ, но на этот раз добавляли постоянное количество антитела к CD28. В данном случае добавление CD28 частично блокировало активность bsAb6054 на клетках IM9 (EC50 2,1E09M, S/N 28,7) и немного увеличивало активность на клетках U266B1 (EC50 6,1E-09M, S/N 8,6). Вероятно, это объясняется уровнем костимулирующих молекул CD80 и CD86, эндогенно экспрессируемых на этих линиях клеток. Клетки IM9 имеют высокие эндогенные уровни CD80 и CD86. Таким образом, добавление антитела к CD28 в биоанализ блокирует естественное взаимодействие CD28 на клетках Jurkat с его лигандами CD80 и CD86, снижая в итоге активность. U266B1 имеет низкие уровни CD80 и CD86. В данном случае добавление CD28 стимулирует сигнализацию CD28 в клетках Jurkat, повышая активность (таблица 9).

Таблица 9. Активность биспецифических антител MAGE-A4 × CD3 в комбинации с 2 нМ mAb5705 (антитело к CD28) в биоанализе с репортером Jurkat/NF-κB-Luc/АПК

Антитело			Jurkat/ NF-κB Luc cl.1C11+IM-9	Jurkat/ NF-κB Luc cl.1C11+U266
----------	--	--	-----------------------------------	-----------------------------------

	VH1	VH2	EC50 (нМ)	Кратность активации	EC50 (нМ)	Кратность активации
bsAb6043 +2 нМ mAb5705 (CD28)	mAb31339 N2	mAb7221 G	H/O	1,1	H/O	0,9
bsAb6054 +2 нМ mAb5705 (CD28)	mAb31339 N2	mAb7195P	2,10E-09	28,7	6,10E-09	8,6
mAb4241+ 2 нМ mAb5705 (CD28)	mAb8767P 2	mAb7221 G	H/O	0,7	H/O	1,3
mAb3905+ 2 нМ mAb5705 (CD28)	mAb17363 N	mAb7195P	H/O	0,7	H/O	1

[247] В дополнение к антителам, обсуждаемым выше с отсылкой к таблице 8, mAb5705 представляет собой антитело к CD28, содержащее HCVR с SEQ ID NO: 85 и LCVR с SEQ ID NO: 93.

Пример 5. Специфичность к пептиду в биоанализе с репортером Jurkat/NF-κB-Luc/АПК

[248] Функциональный биоанализ на полученных генно-инженерными методами Т-клетках/АПК с репортером Jurkat/NF-κB-Luc/АПК также использовали для оценки того, сохранили ли биспецифические антитела к MAGE-A4 × CD3 селективность в отношении пептида MAGE-A4 относительно родственных пептидов, указанных в таблице 7. В этом анализе к клеткам T2 добавляли, как описано ранее, целевой пептид MAGE-A4 286-294 или не целевые пептиды с родственной последовательностью (таблица 7). Как представлено в таблице 10, оба биспецифических антитела bsAb6043 (MAGE-A4 × CD3 среднеаффинное) и bsAb6054 (MAGE-A4 × CD3 высокоаффинное) стимулировали NF-κ B-зависимую репортерную активность при инкубации с клетками T2 с добавлением пептида MAGE-A4 286-294. Активность также обнаруживали при инкубации с клетками T2 с добавлением нецелевых пептидов AOX1 795-803 и SHTN1 198-206. Таким образом, антитело bsAb6043 стимулировало репортерную активность со значениями EC50 3,0E-10 М, 3,3E-10 М и 3,5E-09 М и значениями S/N 75,2, 40,4 и 75,3 для пептидов MAGE-A4 293-294, AOX1 795-803 и SHTN1 198-206 соответственно. Антитело bsAb6054 стимулировало репортерную

активность со значениями EC50 2,0E-12 M, 2,1E-11 M и 1,3E-09 M и значениями S/N 78,7, 36 и 81,1 для пептидов MAGE-A4 286-294, AOX1 795-803 и SHTN1 198-206 соответственно. Несвязывающиеся контрольные биспецифические антитела со среднеаффинным плечом к CD3 (mAb4241) или высокоаффинным плечом к CD3 (mAb3905) имели минимальную активность, со значениями $S/N \leq 2,9$.

Таблица 10. Активность биспецифических антител к MAGE-A4 × CD3 в отношении MAGE-A4 и родственных пептидов в биоанализе с репортером Jurkat/NF-κB-Лус/добавление T2

Линия клеток	bsAb6043		bsAb6054		mAb4241		mAb3905	
	EC50 (M)	Кратность изменения						
T2 с добавлением MAGE-A4 286-294	3,00E-10	75,3	2,00E-12	78,7	> 20 нМ	1,9	> 20 нМ	1
T2 с добавлением FN1 2182-2190	> 2,0E-08	1	> 2,0E-08	1	> 2,0E-08	1,6	> 2,0E-08	1
T2 с добавлением AOX1 795-803	3,30E-10	40,4	2,10E-11	36	> 20 нМ	1	> 20 нМ	1
T2 с добавлением PSME2 145-153	> 2,0E-08	1	> 2,0E-08	1	> 2,0E-08	1,4	> 2,0E-08	1
T2 с добавлением	> 2,0E-08	1	> 2,0E-08	1	> 2,0E-08	1,8	> 2,0E-08	1

PCDHGC 3 337-345								
T2 с добавле- нием SHTN1 198-206	3,50E- 09	75,3	1,30E- 09	81,1	> 20 нМ	1,9	> 20 нМ	1
T2 с добавле- нием SMIM11 A 4-12	> 2,0E- 08	1,2	> 2,0E- 08	1	> 2,0E- 08	2,2	> 2,0E- 08	1
T2 с добавле- нием RABGAP 1L 408- 416	> 2,0E- 08	1,1	> 2,0E- 08	1	> 2,0E- 08	2,1	> 2,0E- 08	1
T2 с добавле- нием CNOT1 1965-1973	> 2,0E- 08	1	> 2,0E- 08	1	> 2,0E- 08	2,9	> 2,0E- 08	1
T2 с добавле- нием MRPL37 334-342	> 2,0E- 08	1,2	> 2,0E- 08	2,4	> 2,0E- 08	1,1	> 2,0E- 08	1
T2 с добавле- нием CARD8 170-178	> 2,0E- 08	1,8	> 2,0E- 08	1,2	> 2,0E- 08	1	> 2,0E- 08	1
T2 с	> 2,0E-	1,9	> 2,0E-	2,8	> 2,0E-	1	> 2,0E-	1

добавлением PLEKHN 2 790-798	08		08		08		08	
T2 с добавлением NBAS 2063-2071	> 2,0E-08	1,6	> 2,0E-08	1,3	> 2,0E-08	1	> 2,0E-08	1
T2 с добавлением TEP1 2156-2164	> 2,0E-08	1,9	> 2,0E-08	1,2	> 2,0E-08	1	> 2,0E-08	1
T2 с добавлением HEATR5 A 1925-1933	> 2,0E-08	2,1	> 2,0E-08	1,2	> 2,0E-08	1	> 2,0E-08	1
T2, без добавления	> 2,0E-08	1,5	> 2,0E-08	1,2	> 2,0E-08	1,1	> 2,0E-08	1

Пример 6. Первичный анализ уничтожения на основе визуализации

[249] Чтобы оценить способность биспецифических антител к MAGE-A4 × CD3 перенаправлять Т-клеточный ответ на злокачественные клетки, выполняли основанный на визуализации мультиплексный анализ опосредованного первичными Т-клетками уничтожения. Если коротко, CD8⁺ Т-клетки выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК), используя разделение магнитными гранулами (Miltenyi Biotec кат. № 130-045-201) в соответствии с протоколом производителя, и представляющие антиген MAGE-A4 286-294 положительные по HLA-A*02:01 клетки линии IM9 предварительно маркировали с помощью CellTrace™ Violet (Thermo Fisher C34557) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки множественной миеломы IM9 (10 000) объединяли с CD8⁺ Т-клетками (25 000) в 100 мкл среды для стимуляции (X Vivo 15+10% FBS+1% HEPES+1% NaPyr+1% NEAA+0,01 mM BME) в 96-луночных планшетах для визуализации (Perkin Elmer кат. № 6055308). К клеткам добавляли

трехкратные последовательные разведения антител в диапазоне от 20 нМ до 27,4 пМ в еще 100 мкл среды для стимуляции. После 72-часовой инкубации отбирали 50 мкл супернатанта для анализов высвобождения цитокинов (см. ниже) и к клеткам добавляли 15 мкл разведенного 1 : 1000 (в PBS) ядерного красителя DRAQ5 (Thermo Fisher кат. № 62252). Изображения DRAQ5-меченых ядер и меченых Cell-Trace Violet АПК получали на приборе Opera Phenix (Perkin Elmer), и количество жизнеспособных клеток IM9 во всех условиях (популяция, меченная как CellTrace™ Violet, так и DRAQ5) вычислялась с использованием программного обеспечения для анализа Harmony (Perkin Elmer). Значения EC50 невозможно было сгенерировать из полученных несигмоидальных кривых, поэтому % жизнеспособных клеток IM9 (нормализованных к лункам без антитела) изображен для дозы 6,6 нМ (самая высокая протестированная доза, при которой несвязывающийся контроль был неактивным). Как представлено в таблице 11, антитело bsAb6043 (биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 (7221G) среднеаффинное) не оказывало положительного влияния на %жизнеспособных клеток IM9, но bsAb6054 (биспецифическое антитело к MAGE-A4 × CD3 высокоаффинное) снижало популяцию IM9 до 38%. Добавление 2 нМ агонистического антитела к CD28 удваивало количество жизнеспособных клеток (80%) (таблица 9). Это может быть связано с способностью mAb5705 блокировать CD28, тем самым ингибируя его взаимодействие с CD80 и CD86, которые эндогенно экспрессируются на клетках IM9. Несвязывающийся контроль и биспецифические антитела к CD3 mAb4241 (средняя аффинность к CD) и mAb3905 (высокая аффинность к CD3) не проявляли активности при анализе.

Таблица 11. Анализ Т-клеточной цитотоксичности на основе визуализации

Условия обработки	% жизнеспособности при 6,6 нМ			
	bsAb6043	bsAb6054	mAb4241	mAb3905
Только антитело	91	38	99	109
Антитело+mAb 5705 (CD28) 2 нМ	109	80	103	137

Пример 7. Анализ первичного высвобождения цитокинов

[250] Высвобождение IL2 и IFN-гамма также оценивали в супернатантах клеточной культуры, отобранных при дозах 6,6 нМ, которые использовались в визуализационном анализе уничтожения, описанном выше. Уровни цитокинов определяли с помощью AlphaLisa (Perkin Elmer, кат. № AL221F, AL217F) в соответствии с инструкциями производителя, а значения RLU нормализовали к необработанным лункам для определения значений S/N. Как показано в таблице 12, антитело bsAb6043 (биспецифическое антитело MAGE-A4 × CD3 (7221G) среднеаффинное) не приводило к высвобождению IL2 или IFN-гамма, а более высокоаффинное биспецифическое антитело MAGE-A4 × CD3 bsAb6054 индуцировала умеренную продукцию IL2 и IFN-гамма с значениями S/N 2,1 и 2,4

соответственно. Добавление антитела к CD28 (mAb5705) не оказывало существенного влияния на продукцию цитокинов (таблица 12).

Таблица 12. Высвобождение IL2 и IFN-гамма в трехдневном анализе уничтожения

	bsAb6043		bsAb6054		mAb4241		mAb3905	
	IL2	IFN- γ	IL2	IFN- γ	IL2	IFN- γ	IL2	IFN- γ
Только антитело	1,2	0,9	2,1	2,4	0,7	0,7	0,6	0,9
Антитело+mAb5705 (CD28) 2 нМ	0,8	0,8	2	1,8	0,8	0,8	1	1,1

Пример 8. Создание MAGE-A4-специфических химерных антигенных рецепторов

[251] Антитела MAGE-A4 31339N2 из таблицы 1 были переформатированы в одноцепочечный переменный фрагмент VL-VH (ScFv) и помещены в конструкт химерного антигенного рецептора (CAR), в которой использовался шарнирный и трансмембранный домен CD8 α , костимулирующий домен 4-1BB и стимулирующий домен CD3-дзета или шарнирный, трансмембранный и сигнальный домен CD28 с использованием нуклеотидных последовательностей HCVR и LCVR антитела к MAGE-A4, соответствующего SEQ ID NO: 1 и 9 соответственно. Полноразмерные нуклеотидные последовательности и последовательности полипептидов тяжелой цепи соответствующего антитела к MAGE-A4 (mAbH31339N2) соответствуют SEQ ID NO: 17 и 18 соответственно. Полноразмерные нуклеотидные последовательности и последовательности полипептидов легкой цепи соответствующего антитела к MAGE-A4 (mAbH31339N2) соответствуют SEQ ID NO: 19 и 20 соответственно. Полноразмерные нуклеотидные последовательности и последовательности полипептидов CAR, нацеленного на HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄, соответствуют SEQ ID NO: 21 и 22 соответственно. В качестве несвязывающего контроля подобный CAR был сконструирован с использованием нуклеотидной последовательности нерелевантного scFv. MAGE-A4-специфический CAR был клонирован в лентивирусный вектор экспрессии (Lenti-X™ Bicistronic Expression System (Neo), Clontech, кат. № 632181), и лентивирусные частицы были созданы с помощью системы Lenti-X Packaging Single-Shot (VSV-G) (Clontech, кат. № 631276) в соответствии с протоколами производителя. Клетки Jurkat, полученные генно-инженерными методами для экспрессии репортера NFkB-зависимой люциферазы (Jurkat/NKFBLuc cl 1C11), затем трансдуцировали конструктом CAR с использованием чашек Петри с предварительно нанесенным покрытием RetroNectin® (Clontech, кат. № T110a) в соответствии с протоколами производителя. После селекции в течение по меньшей мере 2 недель в 500 мкг/мл G418 (Gibco, кат. № 11811-098) была получена следующая линия CAR T-клеток; Jurkat/NKFBLuc cl 1C11/MAGE-A4 (286-

294) 31339 VL-VH CART. В качестве несвязывающего контроля подобный CAR был сконструирован с использованием нуклеотидной последовательности нерелевантного scFv. Эту линию CAR T-клеток оценивали на экспрессию на клеточной поверхности и функциональную активность в ответ на клетки, экспрессирующие MAGE-A4.

Пример 9. Экспрессия на клеточной поверхности конструкторов CAR к MAGE-A4 в клетках Jurkat и активация T-клеток с CAR к MAGE-A4

[252] Относительный уровень экспрессии конструктора CAR к MAGE-A4 на клеточной поверхности в клетках Jurkat/NF-κB-Luc оценивали с помощью проточной цитометрии. Для окрашивания клетки помещали в буфер для окрашивания PBS без кальция и магния (Irving 9240) и 2% BSA (Sigma-Aldrich, кат. № A8577) при плотности 200 000 клеток на лунку в 96-луночной планшете с V-образным дном и окрашивали в течение 30 минут при 4 °C с 10 мкг/мл белка L (Genscript Biotin Protein L, кат. № M00097). После инкубации клетки один раз промывали в буфере для окрашивания и окрашивали вторичным антителом со стрептавидином и Alexa-647 (Biolegend, кат. № 405237) при 0,5 мкг/мл в течение 30 мин при 4 °C. Наконец, клетки окрашивали зеленым флуоресцентным красителем на жизнеспособность (Molecular Probes, кат. № L-34970, разведенным в 50 мкл DMSO) в концентрации 1 : 1000. Затем клетки промывали и фиксировали с использованием 50% раствора BD Cytotfix (Becton Dickinson, кат. № 554655), разведенного PBS. Образцы обрабатывали на проточном цитометре Intellicyt iQue и анализировали с помощью FlowJo 10.2 после гейтирования живых клеток, вычисляя среднюю интенсивность флуоресценции (MFI). Процент клеток, положительных по белку L, рассчитывали, беря количество положительных по белку L клеток и деля на общее количество клеток. В таблице 13 показано, что линия клеток Jurkat/NF-κB-Luc/MAGE-A4 31339N2 VL-VH CAR-T составляла 33,8% CAR-положительных клеток, что измерено с помощью процента окрашенных на белок L. Ненацеленный контрольный CAR экспрессировали 67,2% клеток.

[253] Активность линий CAR T-клеток оценивали с помощью биоанализа CAR T/АПК (антигенпредставляющая клетка). Для проведения биоанализа 50 000 CAR T-клеток добавляли в 96-луночные белые планшеты Thermo-Nunc (Thermo Fisher Scientific, кат. № 136101) в 50 мкл среды для анализа (среда RPMI с 10% FBS и 1% P/S/G) с последующим добавлением 3-кратных последовательных разведений АПК (от 500 000 клеток до 685 клеток) в 50 мкл среды для анализа. Использовали следующие АПК: IM9 (которые эндогенно экспрессируют пептид MAGE-A4 286-294 и являются положительными по HLA-A*02:01) и HEK293 (которые являются отрицательными по MAGE-A4 286-294, но положительными по HLA-A*02:01). Смеси клеток инкубировали во термостате с контролем влажности при 37 °C, 5% CO₂ в течение 5 часов. Активность NF-κB-люциферазы определяли с использованием Promega One-Glo (кат. № E6130) и сканера для планшетов Perkin Elmer Envision. Относительные единицы люциферазы (RLU) были созданы и нанесены на график в GraphPad Prism с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 8-точечной кривой зависимости для получения значений EC50 (по количеству АПК). Также в анализ включали условие отсутствия обработки АПК

для каждой кривой зависимости в виде продолжения трехкратного последовательного разведения и оно представлено как наименьшая доза. Определяли активность CAR-T, регистрировали его в виде EC50 (по количеству АПК), а взяв отношение наивысшего RLU на кривой к самому низкому получали соотношение сигнал/шум (S : N), представленное в таблице 14. CAR-T 31339N2 активировались при инкубации с клетками IM9 с EC50 14 669 клеток и S/N 37,4, тогда как ненацеленные контрольные CAR-T активировались только с кратностью 4,9. Активация не наблюдалась на клетках HEK293 (которые являются отрицательными по MAGE-A4, но положительными по HLA-A2).

Таблица 13. Окрашивание белком L CAR в клетках Jurkat/NFKBLuc cl 1C11

Линия клеток	% Положительных по белку L
Jurkat/NFKBLuc cl. 1C11	3,9
Jurkat/NFKBLuc cl. 1C11/MAGE-A4 (286-294) 31339N2 VL-VH CAR T-клетки	33,8
Jurkat/NFKBLuc cl. 1C11/контрольные VL-VH CAR T-клетки	67,2

Таблица 14. Активация Т-клеток с CAR к MAGE-A4 в биоанализе CAR Т-клеток/АПК

Линия CAR клеток	АПК IM9		АПК HEK293	
	EC50	МАКС. S : N	EC50	МАКС. S : N
Исходная клетка	Н/О	5,2	Н/О	1
31339N2	14 669	37,4	Н/О	0,9
Контрольный CAR	Н/О	4,9	Н/О	0,8

Пример 10. Связывание антител к HLA-A2:MAGE-A4 230-239 по данным проточной цитометрии с клетками T2 с добавлением пептида MAGE-A4 230-239 и родственных нецелевых пептидов

[254] Связывание поверхности клетки антитела к HLA-A2:MAGE-A4 230-239 (mAbM34852N) с HLA-A*02:01-положительными T2-клетками (174 СЕМ.Т2) оценивали методом проточной цитометрии в анализе с добавлением пептида. Для добавления пептидов 1×10^6 клеток T2 инкубировали с 10 мкг/мл В2М человека (h) (EMD Millipore кат.№ 475828) и 100 мкг/мл пептида MAGE-A4 230-239 в 1 мл среды AIM V (Gibco № 31035-025) в течение 16 часов при 37 °С. Клетки промывали в буфере для окрашивания (PBS без кальция и магния (Irvine Scientific кат. № 9319) 2% FBS (Seradigm, партия № 238B15), собирали с использованием буфера для диссоциации клеток (Millipore, кат. № S-004-C) и ресуспендировали в буфере для окрашивания. Клетки после добавления (200 000) высевали на 96-луночные планшеты с V-образным дном (Axygen, кат. № P-96-450V-C-S) и окрашивали трехкратными последовательными разведениями (1,7 пМ - 100 нМ) mAbM34852N или несвязывающимся контрольным антителом (mAb1097) в течение 30 мин при 4 °С. Затем клетки промывали один раз в буфере для окрашивания и инкубировали с

конъюгированным с Alexa Fluor 647 вторичным специфическим к Fc мыши антителом Fab'2 (Jackson ImmunoResearch, кат. № 115-606-071) в концентрации 5 мкг/мл в течение 30 мин при 4 °С. Наконец, клетки окрашивали зеленым флуоресцентным красителем на жизнеспособность (каталог Molecular Probes, кат. № L-34970), разведенным в 50 мкл DMSO в концентрации 1 : 1000. Затем клетки промывали и фиксировали с использованием 50% раствора BD Cytotfix (BD, кат. № 554655), разведенного в PBS. Образцы обрабатывали на проточном цитометре IntelliCyt iQue (Intellicyt) и результаты анализировали с использованием программного обеспечения для анализа Forecyte (IntelliCyt), рассчитывая среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) после гейтирования живых клеток. По значениям MFI строили график в GraphPad Prism, используя четырехпараметрическое логистическое уравнение по 12-точечной кривой зависимости для расчета значений EC₅₀. Также в анализ включали только вторичное антитело (т. е. без первичного антитела) для каждой кривой зависимости в качестве продолжения трехкратного последовательного разведения, и эти данные представлены как наименьшая доза. Соотношение сигнал/шум (S/N) определяли по отношению наибольшего MFI на кривой зависимости к MFI лунок, содержащих только вторичное антитело. Значения EC₅₀ (M) и макс. S/N показаны в таблице 15. Антитело mAbM34852N связывалось с EC₅₀ 4,7 нМ и макс. S/N 243,3, тогда как связывание контрольного антитела (mAb1097) было лишь слабо обнаружимым.

Таблица 15. Связывание антитела к HLA-A2: MAGE-A4 (230-239) с T2-клетками с добавлением MAGE-A4 (230-239) по данным проточной цитометрии

мАт	EC ₅₀ (M)	Макс. S/N
mAbM34852N	4,7E-09	243,3
mAb1097 (изотипический контроль)	Н/О	13,4

Н/О - значения EC₅₀ невозможно определить с точностью, поскольку связывание не достигло насыщения в тестируемом диапазоне концентраций антитела

[255] С помощью вычислительной стратегии компьютерного моделирования было идентифицировано несколько пептидов, родственных MAGE-A4, которые по прогнозу образуют комплексы с HLA-A*02:01. Идентифицированные пептиды сведены в таблицу 16. Связывание с HLA-A2: MAGE-A4 230-239 (mAbM34852N) и несвязывающегося изотипического контрольного антитела (mAb1097) с этими родственными пептидами оценивали при одной концентрации 100 нМ в описанном выше анализе с клетками T2 с добавлением пептидов. Связывание в данном случае показано в таблице 17 в виде отношения MFI: связывание с клетками с добавлением пептидов, деленное на связывание с клетками без добавления. Антитело mAbM34852N связывалось с пептидом MAGE-A4 с соотношением связываний 512,9, в то время как изотипический контроль mAb1097 связывался с соотношением 4,3. mAbM34852N имело сходное связывание с пептидом MAGE-A8 (232-241) с соотношением связываний 870,2; однако не наблюдалось

определимого связывания с остальными пептидами, и связывание для контрольного антитела составляло < 4,3 для всех протестированных пептидов, и это указывает на то, что mAbM34852N обладает терапевтическим потенциалом против MAGE-A4.

Таблица 16. Последовательности пептидов MAGE-A4 (230-239) и спрогнозированных не являющихся мишенями пептидов

Пептид (название гена+местоположение в полноразмерном белке)	Пептидная последовательность	SEQ ID NO.
MAGE-A4 (230-239)	<u>G</u> VYD <u>G</u> RE <u>H</u> T <u>V</u>	122
MAGE-A8 (232-241)	<u>G</u> L <u>Y</u> D <u>G</u> RE <u>H</u> <u>S</u> <u>V</u>	123
THBS3 (116-125)	<u>G</u> L <u>A</u> D <u>G</u> R <u>T</u> H <u>T</u> <u>V</u>	124
LPIN2 (823-832)	<u>G</u> <u>V</u> <u>P</u> D <u>C</u> R <u>I</u> F <u>T</u> <u>V</u>	125
SCL25A19 (111-120)	<u>S</u> <u>V</u> <u>Y</u> D <u>A</u> R <u>E</u> F <u>S</u> <u>V</u>	126
CELSR3 (1594-1603)	<u>G</u> L <u>S</u> D <u>G</u> <u>Q</u> <u>W</u> H <u>T</u> <u>V</u>	127
PAPPA2 (307-316)	<u>G</u> <u>V</u> <u>F</u> D <u>N</u> C <u>S</u> H <u>T</u> <u>V</u>	128
FAT4 (4053-4062)	<u>K</u> <u>V</u> <u>S</u> D <u>G</u> <u>H</u> <u>F</u> H <u>T</u> <u>V</u>	129
MAGE-A10 (254-263)	<u>G</u> L <u>Y</u> D <u>G</u> <u>M</u> E <u>H</u> L <u>I</u>	130
CCDC36 (417-426)	<u>F</u> L <u>C</u> D <u>P</u> R <u>E</u> H <u>L</u> <u>V</u>	131

Изменения последовательности MAGE-A4 (230-239) подчеркнуты

Таблица 17. Связывание антитела к HLA-A2: MAGE-A4 (230-239) с T2-клетками с добавлением родственных пептидов по данным проточной цитометрии

Пептид (название гена+местоположение пептида)	Соотношение связывания антитела (MFI клеток с добавлением/MFI клеток без добавления)	
	mAbM34852N	mAb1097
MAGE-A4 (230-239)	512,9	4,3
MAGE-A8 (232-241)	870,2	3,3
THBS3 (116-125)	1,0	1,0
LPIN2 (823-832)	0,9	0,9
SCL25A19 (111-120)	0,8	0,9
CELSR3 (1594-1603)	0,8	0,9
PAPPA2 (307-316)	0,9	0,9
FAT4 (4053-4062)	1,0	1,1
MAGE-A10 (254-263)	0,9	1,3
CCDC36 (417-426)	1,0	1,1

Пример 11. Аланиновое сканирование HLA-A2: MAGE-A4 (230-239)

[256] Связывание поверхности клетки антитела к HLA-A2: MAGE-A4 230-239 (mAbM34852N) с HLA-A*02:01-положительными T2-клетками (174 СЕМ.Т2) оценивали методом проточной цитометрии в анализе с добавлением пептида. Для добавления 1×10^6

клеток T2 инкубировали с 10 мкг/мл B2M человека (h) (EMD Millipore кат. № 475828) и 100 мкг/мл пептида MAGE-A4 230-239 в 1 мл среды AIM V (Gibco кат. № 31035-025) в течение 16 ч при 37 °С. Клетки промывали в буфере для окрашивания (PBS без кальция и магния (Irvine Scientific кат. № 9319) + 2% FBS (Seradigm, партия № 238B15), собирали с использованием буфера для диссоциации клеток (Millipore, кат. № S-004-C) и ресуспендировали в буфере для окрашивания. Клетки после добавления (200 000) высевали в 96-луночные планшеты с V-образным дном (Axygen, кат. № P-96-450 V-C-S) и окрашивали трехкратными последовательными разведениями (1,7 пМ-100 нМ) антитела mAbM34852N или несвязывающегося изотипического контрольного антитела в течение 30 мин при 4 °С. Затем клетки промывали один раз в буфере для окрашивания и инкубировали с конъюгированным с Alexa Fluor 647 вторичным специфическим к Fc мыши антителом Fab'2 (Jackson ImmunoResearch, кат. № 115-606-071) при 5 мкг/мл в течение 30 мин при 4 °С. Наконец, клетки окрашивали зеленым флуоресцентным красителем на жизнеспособность (Molecular Probes кат. № L-34970), разводили в 50 мкл DMSO в концентрации 1 : 1000. Затем клетки промывали и фиксировали с использованием 50% раствора BD Cytotfix (BD, кат. № 554655), разведенном в PBS. Образцы обрабатывали на проточном цитометре IntelliCyt iQue (Intellicyt) и результаты анализировали с использованием программного обеспечения для анализа Forecyte (IntelliCyt), рассчитывая среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) после гейтирования живых клеток. По значениям MFI строили график в GraphPad Prism, используя четырехпараметрическое логистическое уравнение по 12-точечной кривой зависимости для расчета значений EC₅₀. Также в анализ включали только вторичное антитело (т. е. без первичного антитела) для каждой кривой зависимости в качестве продолжения трехкратного последовательного разведения, и эти данные представлены как наименьшая доза. Соотношение сигнал/шум (S/N) определяли по отношению наибольшего MFI на кривой зависимости к MFI лунок, содержащих только вторичное антитело. Значения EC₅₀ (М) и макс. S/N показаны в таблице 19. Антитело mAbM34852N связывалось с EC₅₀ 4,7 нМ и макс. S/N 243,3, тогда как связывание контрольного антитела было лишь слабо обнаружимым. Результаты анализа аланинового сканирования показывают, что mAbM34852 проявлял связывание по всему пептиду MAGE-A4 (230-239).

Таблица 18. Последовательности пептидов аланинового сканирования MAGE-A4 (230-239)

Пептид (название гена+местоположение пептида)	Пептидная последовательность	SEQ ID NO.
MAGE-A4 (230-239)	GVYDGREHTV	122
MAGE-A4 (230-239) G230A	<u>A</u>VYDGREHTV	132
MAGE-A4 (230-239) V231A	G<u>A</u>YDGREHTV	133

MAGE-A4 (230-239) Y232A	GV<u>A</u>DGREHTV	134
MAGE-A4 (230-239) D233A	GVY<u>A</u>GREHTV	135
MAGE-A4 (230-239) G234A	GVYD<u>A</u>REHTV	136
MAGE-A4 (230-239) R235A	GVYD<u>G</u>AHTV	137
MAGE-A4 (230-239) E236A	GVYD<u>G</u>R<u>A</u>HTV	138
MAGE-A4 (230-239) H237A	GVYD<u>G</u>R<u>E</u><u>A</u>TV	139
MAGE-A4 (230-239) T238A	GVYD<u>G</u>R<u>E</u>H<u>A</u><u>V</u>	140
MAGE-A4 (230-239) V239A	GVYD<u>G</u>R<u>E</u>H<u>T</u><u>A</u>	141

Таблица 19. Связывание антитела к HLA-A2:MAGE-A4 (230-239) с клетками T2 с добавлением пептидов аланинового сканирования по данным проточной цитометрии

Пептид (название гена+местоположение пептида)	Соотношение связывания антитела (MFI клеток с добавлением/MFI клеток без добавления)	
	mAbM34852N	Изотипический контроль
MAGE-A4 (230-239)	121,3	1
MAGE-A4 (230-239) G230A	38,0	0,5
MAGE-A4 (230-239) V231A	35,5	0,5
MAGE-A4 (230-239) Y232A	1,0	0,5
MAGE-A4 (230-239) D233A	1,4	0,5
MAGE-A4 (230-239) G234A	22,9	0,5
MAGE-A4 (230-239) R235A	4,0	0,5
MAGE-A4 (230-239) E236A	42,6	0,5
MAGE-A4 (230-239) H237A	82,0	0,5
MAGE-A4 (230-239) T238A	108,6	0,5
MAGE-A4 (230-239) V239A	80,0	0,5

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Таблица 20. Идентификаторы последовательности

SEQ ID NO.	ДНК/полипептид	Последовательность
1	ДНК	HCVR mAbM31339N2 и mAbH31339N2
2	Полипептид	HCVR mAbM31339N2 и mAbH31339N2
3	ДНК	HCDR1 mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2
4	Полипептид	HCDR1 mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2
5	ДНК	HCDR2 mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2
6	Полипептид	HCDR2 mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2
7	ДНК	HCDR3 mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2
8	Полипептид	HCDR3 mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2
9	ДНК	LCVR mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2
10	Полипептид	LCVR mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2
11	ДНК	LCDR1 mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2
12	Полипептид	LCDR1 mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2
13	ДНК	LCDR2 mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2; и LCDR2 антитела к CD3-A (mAbH7221G); и LCDR2 антитела к CD3-B (mAbH7195P); и LCDR2 mAbM34852N
14	Полипептид	LCDR2 mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2; и LCDR2 антитела к CD3-A (mAbH7221G); и LCDR2 антитела к CD3-B

		(mAbH7195P); и LCDR2 mAbM34852N
15	ДНК	LCDR3 mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2
16	Полипептид	LCDR3 mAbM31339N, mAbM31339N2 и mAbH31339N2
17	ДНК	mAbH31339N2HC
18	Полипептид	mAbH31339N2HC
19	ДНК	mAbH31339N2LC
20	Полипептид	mAbH31339N2LC
21	ДНК	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен 4-1BB) с полноразмерным 31339N2
22	Полипептид	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен 4-1BB) с полноразмерным 31339N2
23	Полипептид	Линкер (G4S) ₁
24	Полипептид	Линкер (G4S) ₂
25	Полипептид	Линкер (G4S) ₃
26	Полипептид	Линкер GSTSGSGKPGSGEGSTKG
27	Полипептид	Шарнир CD8 α
28	Полипептид	Трансмембранный домен CD8
29	Полипептид	Костимулирующий домен 4-1BB
30	Полипептид	Сигнальный домен CD3-дзета
31	ДНК	Полноразмерный MAGE-A4
32	Полипептид	Полноразмерный MAGE-A4
33	Полипептид	MAGE-A4 (286-294)
34	Полипептид	Шарнир CD28
35	ДНК	Шарнир CD28
36	Полипептид	Трансмембранный домен CD28
37	ДНК	Трансмембранный домен CD28
38	Полипептид	Костимулирующий домен CD28
39	ДНК	Костимулирующий домен CD28
40	Полипептид	FN1 2182-2190

41	Полипептид	AOX1 795-803
42	Полипептид	PSME2 145-153
43	Полипептид	PCDHGC3 337-345
44	Полипептид	SHTN1 198-206
45	Полипептид	SMIM11A 4-12
46	Полипептид	RABGAP1L 408-416
47	Полипептид	CNOT1 1965-1973
48	Полипептид	CARD8 170-178
49	Полипептид	MRPL37 334-342
50	Полипептид	PLEKHH2 790-798
51	Полипептид	NBAS 2063-2071
52	Полипептид	TEP1 2156-2164
53	Полипептид	HEATR5A 1925-1933
54	ДНК	HCVR антитела к CD3-A (mAbH7221G)
55	Полипептид	HCVR антитела к CD3-A (mAbH7221G)
56	ДНК	HCDR1 антитела к CD3-A (mAbH7221G)
57	Полипептид	HCDR1 антитела к CD3-A (mAbH7221G)
58	ДНК	HCDR2 антитела к CD3-A (mAbH7221G)
59	Полипептид	HCDR2 антитела к CD3-A (mAbH7221G)
60	ДНК	HCDR3 антитела к CD3-A (mAbH7221G)
61	Полипептид	HCDR3 антитела к CD3-A (mAbH7221G)
62	ДНК	LCVR антитела к CD3-A (mAbH7221G); и LCVR антитела к CD3-B (mAbH7195P)
63	Полипептид	LCVR антитела к CD3-A (mAbH7221G); и LCVR антитела к CD3-B (mAbH7195P)
64	ДНК	LCDR1 антитела к CD3-A (mAbH7221G); и LCDR1 антитела к CD3-B (mAbH7195P)
65	Полипептид	LCDR1 антитела к CD3-A (mAbH7221G); и LCDR1 антитела к CD3-B (mAbH7195P)
66	ДНК	LCDR3 антитела к CD3-A (mAbH7221G); и LCDR3 антитела к CD3-B (mAbH7195P);
67	Полипептид	LCDR3 антитела к CD3-A (mAbH7221G); и LCDR3 антитела к CD3-B (mAbH7195P);
68	ДНК	HC антитела к CD3-A (mAbH7221G)

69	Полипептид	НС антитела к CD3-A (mAbH7221G)
70	ДНК	LC антитела к CD3-A (mAbH7221G); и LC антитела к CD3-B (mAbH7195P)
71	Полипептид	LC антитела к CD3-A (mAbH7221G); и LC антитела к CD3-B (mAbH7195P)
72	ДНК	HCVR антитела к CD3-B (mAbH7195P)
73	Полипептид	HCVR антитела к CD3-B (mAbH7195P)
74	ДНК	HCDR1 антитела к CD3-B (mAbH7195P)
75	Полипептид	HCDR1 антитела к CD3-B (mAbH7195P)
76	ДНК	HCDR2 антитела к CD3-B (mAbH7195P)
77	Полипептид	HCDR2 антитела к CD3-B (mAbH7195P)
78	ДНК	HCDR3 антитела к CD3-B (mAbH7195P)
79	Полипептид	HCDR3 антитела к CD3-B (mAbH7195P)
80	ДНК	НС антитела к CD3-B (mAbH7195P)
81	Полипептид	НС антитела к CD3-B (mAbH7195P)
82	ДНК	HCVR mAbM31339N
83	Полипептид	HCVR mAbM31339N
84	ДНК	HCVR CD28
85	Полипептид	HCVR CD28
86	ДНК	HCDR1 CD28
87	Полипептид	HCDR1 CD28
88	ДНК	HCDR2 CD28
89	Полипептид	HCDR2 CD28
90	ДНК	HCDR3 CD28
91	Полипептид	HCDR3 CD28
92	ДНК	LCVR CD28
93	Полипептид	LCVR CD28
94	ДНК	LCDR1 CD28
95	Полипептид	LCDR1 CD28
96	ДНК	LCDR2 CD28
97	Полипептид	LCDR2 CD28
98	ДНК	LCDR3 CD28
99	Полипептид	LCDR3 CD28
100	ДНК	НС CD28

101	Полипептид	HC CD28
102	ДНК	LC CD28
103	Полипептид	LC CD28
104	ДНК	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен CD28) с полноразмерным 31339N2
105	Полипептид	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен CD28) с полноразмерным 31339N2
106	ДНК	HCVR mAbM34852N
107	Полипептид	HCVR mAbM34852N
108	ДНК	HCDR1 mAbM34852N
109	Полипептид	HCDR1 mAbM34852N
110	ДНК	HCDR2 mAbM34852N
111	Полипептид	HCDR2 mAbM34852N
112	ДНК	HCDR3 mAbM34852N
113	Полипептид	HCDR3 mAbM34852N
114	ДНК	LCVR mAbM34852N
115	Полипептид	LCVR mAbM34852N
116	ДНК	LCDR1 mAbM34852N
117	Полипептид	LCDR1 mAbM34852N
118	ДНК	LCDR3 mAbM34852N
119	Полипептид	LCDR3 mAbM34852N
120	Полипептид	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен 4-1BB) с полноразмерным 31339N2
121	Полипептид	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен CD28) с полноразмерным 31339N2
122	Полипептид	MAGE-A4 (230-239)
123	Полипептид	MAGE-A8 (232-241)
124	Полипептид	THBS3 (116-125)
125	Полипептид	LPIN2 (823-832)
126	Полипептид	SCL25A19 (111-120)

127	Полипептид	CELSR3 (1594-1603)
128	Полипептид	PAPPA2 (307-316)
129	Полипептид	FAT4 (4053-4062)
130	Полипептид	MAGE-A10 (254-263)
131	Полипептид	CCDC36 (417-426)
132	Полипептид	MAGE-A4 (230-239) G230A
133	Полипептид	MAGE-A4 (230-239) V231A
134	Полипептид	MAGE-A4 (230-239) Y232A
135	Полипептид	MAGE-A4 (230-239) D233A
136	Полипептид	MAGE-A4 (230-239) G234A
137	Полипептид	MAGE-A4 (230-239) R235A
138	Полипептид	MAGE-A4 (230-239) E236A
139	Полипептид	MAGE-A4 (230-239) H237A
140	Полипептид	MAGE-A4 (230-239) T238A
141	Полипептид	MAGE-A4 (230-239) V239A

АННОТИРОВАННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

[257] В следующих аннотированных последовательностях части идентифицируются чередованием неподчеркнутых частей с подчеркнутыми, а порядок частей соответствует порядку, указанному под каждой последовательностью (т. е. первая неподчеркнутая часть представляет собой VL, следующая подчеркнутая часть представляет собой (G4S)₃, следующая неподчеркнутая часть представляет собой VH, и так далее).

MAGE-A4(286-294) 31339N2 VL-VH BBz CAR (SEQ ID NO: 22)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSIDTFLNWFYQQKPGKVPKLLIYAASNLES
 GVPSRFSGSGSGTVFTLTISRLLQPEDFATYYCQQSYSIPPITFGQGTRVEIKRGGGGSGGG
GSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSEYYLTWIRQAPGKGLDWIAYIS
 SSGYNIYYADSVKDRFTISRDNQKNSLFLQMNNLRAEDTAVYFCAREGVTDGMDVWG
 QGTTVTVSSGGGGSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRK
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
 LPPR

VL

(G4S)₃

VH

G4S

Шарнир/ТМ CD8

Костимулирующий домен 4-1BB

CD3Z

MAGE-A4(286-294) 31339N2 VL-VH BBz CAR (SEQ ID NO: 120)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDTFLNWFYQQKPGKVPKLLIYAASNLES
 GVPSRFSGSGSGTVFTLTISRLQPEDFATYYCQQSYSIPPITFGQGTRVEIKGGGGSGGGG
SGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSEYYLTWIRQAPGKGLDWIAYISS
 SGYNIYYADSVKDRFTISRDNKGKNSLFLQMNNLRAEDTAVYFCAREGVTDGMDVWGQ
 GTT~~VT~~VSSGGGGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
 WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP
 PR

VL

(G4S)3

VH

G4S

Шарнир/ТМ CD8

Костимулирующий домен 4-1BB

CD3Z

MAGE-A4(286-294) 31339N2 VL-VH шарнир CD28/ТМ/цитоCD3z CAR (SEQ ID NO: 105)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDTFLNWFYQQKPGKVPKLLIYAASNLES
 GVPSRFSGSGSGTVFTLTISRLQPEDFATYYCQQSYSIPPITFGQGTRVEIKRGGGGSGGG
GSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSEYYLTWIRQAPGKGLDWIAYIS
 SSGYNIYYADSVKDRFTISRDNKGKNSLFLQMNNLRAEDTAVYFCAREGVTDGMDVWG
 QGTT~~VT~~VSSGGGGSEIVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVV
GGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY
 RSRVKFSRSADAPAYKQGONQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

VL

(G4S)3

VH

G4S

Шарнир CD28

ТМ CD28

Костимулирующий домен CD28

CD3Z

MAGE-A4(286-294) 31339N2 VL-VH шарнир CD28/ТМ/цитоCD3z CAR (SEQ ID NO: 121)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDTFLNWFYQQKPGKVPKLLIYAASNLES
 GVPSRFSGSGSGTVFTLTISRLQPEDFATYYCQQSYSIPPITFGQGTRVEIKGGGGSGGGG

SGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSEYYLTWIRQAPGKGLDWIAYISS
SGYNIYYADSVKDRFTISRDNQKNSLFLQMNNLRAEDTAVYFCAREGVTDGMDVWGQ
GTTVTVSSGGGGSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVG
GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR
SRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

VL

(G4S)₃

VH

G4S

Шарнир CD28

TM CD28

Костимулирующий домен CD28

CD3Z

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Напротив, специалистам в данной области будут очевидны различные модификации данного изобретения, помимо модификаций, описанных в настоящем документе, из предшествующего описания. Предполагается, что такие модификации включены в объем приложенной формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий белок, который специфически связывается с HLA-связанным ассоциированным с меланомой антигеном A4 (MAGE-A4), причем антигенсвязывающий белок содержит переменную область легкой цепи (LCVR) и переменную область тяжелой цепи (HCVR), при этом LCVR содержит определяющие комплементарность области (CDR) LCVR, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 115, и при этом HCVR содержит CDR HCVR, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 107.

2. Антигенсвязывающий белок по п. 1, в котором LCVR содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 115.

3. Антигенсвязывающий белок по п. 1 или п. 2, в котором HCVR содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 107.

4. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-3, в котором указанный MAGE-A4-специфический антигенсвязывающий белок взаимодействует с аминокислотами 286-294 из SEQ ID NO: 32 или их частью.

5. MAGE-A4-специфический химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий от N-конца к C-концу: (а) внеклеточный лиганд-связывающий домен, содержащий домен переменного одноцепочечного фрагмента (scFv) к MAGE-A4, содержащий переменную область легкой цепи (LCVR) и переменную область тяжелой цепи (HCVR); (b) шарнир; (c) трансмембранный домен; и (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен 4-1BB или костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета, причем LCVR содержит определяющие комплементарность области (CDR) LCVR, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 115, и CDR HCVR, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 107.

6. MAGE-A4-специфический CAR по п. 5, содержащий от N-конца к C-концу: (а) внеклеточный лиганд-связывающий домен; (b) шарнир; (c) трансмембранный домен; и (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен и сигнальный домен.

7. MAGE-A4-специфический CAR по п. 5, в котором домен scFv к MAGE-A4 содержит первый линкер между LCVR и HCVR.

8. MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-7, дополнительно содержащий второй линкер между внеклеточным лиганд-связывающим доменом и шарниром.

9. MAGE-A4-специфический CAR по п. 8, в котором первый линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-26, и при этом второй линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-26.

10. MAGE-A4-специфический CAR по п. 9, в котором первый линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 25, а второй линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 23.

11. MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-10, в котором шарнир, трансмембранный домен или оба взяты из полипептида CD8 α .

12. MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-11, в котором костимулирующий домен содержит костимулирующий домен 4-1BB.

13. MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-11, в котором костимулирующий домен содержит костимулирующий домен CD28.

14. MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-10, 12 и 13, в котором шарнир, трансмембранный домен или оба взяты из полипептида CD28.

15. MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-12, в котором шарнир содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 27.

16. MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-12, в котором трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 28.

17. MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-12, в котором костимулирующий домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 29.

18. MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-10 и 12-14, в котором шарнир содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 34.

19. MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-10, 12-14 и 18, в котором трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 36.

20. MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-10 и 12-14, 18 и 19, в котором костимулирующий домен CD28 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 38.

21. MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-20, в котором сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета.

22. MAGE-A4-специфический CAR по п. 21, в котором сигнальный домен CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 30.

23. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4, представляющий собой MAGE-A4-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

24. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23 или MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22, причем указанный антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 83.

25. Антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR по п. 24, причем HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO: 8.

26. Антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR по п. 25, причем указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

27. Антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR по п. 25, причем указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83.

28. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23 или MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22, причем указанный антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107.

28. Антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR по п. 28, причем HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 109, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 111, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 113.

29. Антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR по п. 28, причем указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107.

30. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22 или антигенсвязывающий белок либо MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 24-29, причем указанный антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в LCVR, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 115.

31. Антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR по п. 30, причем LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16.

32. Антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR по п. 31, причем указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

33. Антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR по п. 30, причем LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 117, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 119.

34. Антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR по п. 33,

причем указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 115.

35. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23 или MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22, причем указанный антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR содержит HCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и LCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

36. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23 или MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22, причем указанный антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR содержит HCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83, и LCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

37. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23 или MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22, причем указанный антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR содержит HCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, и LCVR, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 115.

38. MAGE-A4-специфический CAR по п. 5, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22.

39. MAGE-A4-специфический CAR по п. 5, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 105.

40. MAGE-A4-специфический CAR по п. 5, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 120.

41. MAGE-A4-специфический CAR по п. 5, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 121.

42. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41 или антигенсвязывающий белок либо MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 24-37, причем указанный антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR специфически связывается с одной или более аминокислотами в положениях 286-294 SEQ ID NO: 32.

43. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41 или антигенсвязывающий белок либо MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 24-37 и 42, причем указанный антигенсвязывающий белок или MAGE-A4-специфический CAR взаимодействует с одной или более аминокислотами указанного HLA.

44. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41 или антигенсвязывающий белок либо MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 24-37, 42 и 43, причем указанный HLA представляет собой HLA-A2.

45. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенсвязывающий

белок по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41 или антигенсвязывающий белок либо MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 24-37 и 42-44.

46. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, содержащая нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 21.

47. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, содержащая нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 104.

48. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45-47.

49. Вектор по п. 48, представляющий собой ДНК-вектор, РНК-вектор, плазмиду, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или ретровирусный вектор.

50. Вектор по п. 49, представляющий собой лентивирусный вектор.

51. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45-47 или вектор по любому из пп. 48-50.

52. Клетка по п. 51, представляющая собой Т-клетку человека.

53. Полученная генно-инженерными методами клетка, содержащая антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41 или антигенсвязывающий белок либо MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 24-37 и 42-44.

54. Полученная генно-инженерными методами клетка по п. 53, которая представляет собой иммунную клетку.

55. Полученная генно-инженерными методами клетка по п. 54, причем иммунная клетка представляет собой эффекторную иммунную клетку.

56. Полученная генно-инженерными методами клетка по п. 55, причем иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-лимфоцит.

57. Полученная генно-инженерными методами клетка по п. 56, причем Т-лимфоцит представляет собой воспалительный Т-лимфоцит, цитотоксический Т-лимфоцит, регуляторный Т-лимфоцит или хелперный Т-лимфоцит.

58. Полученная генно-инженерными методами клетка по п. 57, которая представляет собой CD8+ цитотоксический Т-лимфоцит.

59. Полученная генно-инженерными методами клетка по любому из пп. 53-58 для применения в лечении злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4.

60. Полученная генно-инженерными методами клетка по п. 59, причем злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой множественную миелому.

61. Полученная генно-инженерными методами клетка по п. 59, причем злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой меланому.

62. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека, содержащая химерный антигенный рецептор, содержащий от N-конца к С-концу: (а) внеклеточный лиганд-связывающий домен, содержащий домен варибельного одноцепочечного

фрагмента (scFv) к MAGE-A4, содержащий вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR); (b) шарнир; (c) трансмембранный домен; и (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен 4-1BB или костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета, причем LCVR содержит определяющие комплементарность области (CDR) LCVR, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 115, и CDR HCVR, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 107.

63. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по п. 62, причем указанный scFv к MAGE-A4 специфически связывается с одним или более аминокислотными остатками в положениях 286-294 SEQ ID NO: 32.

64. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по п. 62 или 63, причем домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2/10.

65. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по п. 62 или 63, причем домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 2/83.

66. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по п. 62 или 63, причем домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 107/115.

67. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по п. 64 или 65, причем HCVR содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и LCVR содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), при этом HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, а LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16.

68. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по п. 66, причем HCVR содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и LCVR содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 109, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 111, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 113, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 117, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, а LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 119.

69. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по любому из пп. 62-68, причем шарнир содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 27.

70. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по любому из пп. 62-69, причем трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 28.

71. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по любому из пп. 62-70, причем костимулирующий домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 29.

72. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по любому из пп. 62-68, причем шарнир содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 34.

73. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по любому из пп. 62-68 и 72, причем трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 36.

74. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по любому из пп. 62-68, 72 и 73, причем костимулирующий домен CD28 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 38.

75. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по любому из пп. 62-74, причем сигнальный домен CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 30.

76. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по п. 62, содержащая химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22.

77. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по п. 62, содержащая химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 105.

78. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по п. 62, содержащая химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 120.

79. Полученная генно-инженерными методами Т-клетка человека по п. 62, содержащая химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 121.

80. Фармацевтическая композиция, содержащая генетически модифицированную Т-клетку человека и фармацевтически приемлемый носитель, причем генетически модифицированная Т-клетка человека содержит антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41 или антигенсвязывающий белок либо MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 24-37 и 42-44.

81. Фармацевтическая композиция, содержащая полученную генно-инженерными методами клетку по любому из пп. 53-58 и фармацевтически приемлемый носитель.

82. Фармацевтическая композиция, содержащая полученную генно-инженерными методами Т-клетку человека по любому из пп. 62-79 и фармацевтически приемлемый носитель.

83. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 80-82 для применения в лечении злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4.

84. Фармацевтическая композиция по п. 83, причем злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой множественную миелому.

85. Фармацевтическая композиция по п. 83, причем злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой меланому.

86. Применение антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфического CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41, или антигенсвязывающего белка либо MAGE-A4-специфического CAR по любому из пп. 24-37 и 42-44, молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45-47, вектора по любому из пп. 48-50, клетки по п. 51 или 52, полученной генно-инженерными методами клетки по любому из пп. 53-58, или полученной генно-инженерными методами Т-клетки человека по любому из пп. 62-79 в получении лекарственного препарата для лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4.

87. Применение по п. 86, причем злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой множественную миелому.

88. Применение по п. 86, причем злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой меланому.

89. Способ усиления активности Т-лимфоцитов у субъекта, включающий введение субъекту Т-лимфоцита, содержащего антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфического CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41 или антигенсвязывающего белка либо MAGE-A4-специфического CAR по любому из пп. 24-37 и 42-44.

90. Способ лечения субъекта, страдающего онкологическим заболеванием, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества Т-лимфоцита, содержащего антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41 или антигенсвязывающий белок либо MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 24-37 и 42-44.

91. Способ стимуляции Т-клеточно-опосредованного иммунного ответа на популяцию клеток-мишеней или ткань у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфического CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41 или антигенсвязывающего белка либо MAGE-A4-специфического CAR по любому из пп. 24-37 и 42-44.

92. Способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфического CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41 или антигенсвязывающего белка либо MAGE-A4-специфического CAR по любому из пп. 24-37 и 42-44.

93. Способ по любому из пп. 89-92, в котором субъект представляет собой человека.

94. Способ по любому из пп. 89-93, причем субъект имеет множественную миелому, синовиальную саркому, рак пищевода, рак головы и шеи, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак матки, рак желудка, рак шейки матки, рак молочной железы или меланому.

95. Способ по п. 94, причем субъект имеет множественную миелому.

96. Генно-инженерный способ получения популяции клеток для экспрессии антигенсвязывающего белка, который специфически связывает HLA-связанный MAGE-A4 или MAGE-A4-специфический химерный антигенный рецептор (CAR), включающий:

(а) введение в популяцию иммунных клеток молекул нуклеиновых кислот, кодирующих антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41 или антигенсвязывающий белок либо MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 24-37 и 42-44;

(b) культивирование указанной популяции иммунных клеток в условиях, подходящих для экспрессии указанных молекул нуклеиновой кислоты; и

(с) выделение указанных иммунных клеток, экспрессирующих указанный MAGE-A4-специфический антигенсвязывающий белок на поверхности клеток.

97. Способ по п. 96, дополнительно включающий получение указанной популяции иммунных клеток от субъекта до введения указанной молекулы нуклеиновой кислоты.

98. Способ лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4, у субъекта, включающий:

(а) получение с помощью генно-инженерных методов популяции клеток по п. 96 или п. 97; и

(b) повторное введение указанному субъекту указанной популяции клеток, экспрессирующих указанный химерный антигенный рецептор.

99. Способ по п. 98, причем указанное злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой множественную миелому.

100. Выделенный антигенсвязывающий белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с HLA-связанным ассоциированным с меланомой антигеном A4 (MAGE-A4), и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, причем первый антигенсвязывающий домен содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (A1-HCVR), и три CDR легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (A1-LCVR), и второй антигенсвязывающий домен содержит три CDR тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (A2-HCVR), и три CDR легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (A2-LCVR), при этом A1-HCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, A1-LCVR содержит аминокислотную

последовательность с SEQ ID NO: 10, A2-NCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 55 и A2-LCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10.

101. Выделенный антигенсвязывающий белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с HLA-связанным ассоциированным с меланомой антигеном A4 (MAGE-A4), и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3 человека, причем первый антигенсвязывающий домен содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (A1-NCDR1, A1-NCDR2 и A1-NCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (A1-NCVR), и три CDR легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (A1-LCVR), и второй антигенсвязывающий домен содержит три CDR тяжелой цепи (A2-NCDR1, A2-NCDR2 и A2-NCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (A2-NCVR), и три CDR легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (A2-LCVR), при этом A1-NCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, A1-LCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10, A2-NCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 73 и A2-LCVR содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10.

102. Выделенный антигенсвязывающий белок по п. 100 или п. 101, взаимодействующий с аминокислотами 286-294 из SEQ ID NO: 32 или их частью.

103. Выделенный антигенсвязывающий белок по п. 100 или 101, представляющий собой CAR.

104. Выделенный антигенсвязывающий белок по п. 100 или 101, представляющий собой биспецифическое антитело.

105. Выделенный антигенсвязывающий белок по любому из пп. 100-104, взаимодействующий с аминокислотами 286-294 из SEQ ID NO: 32 или их частью.

106. Выделенный антигенсвязывающий белок по любому из пп. 100-105, взаимодействующий с CD3.

107. Выделенный антигенсвязывающий белок по п. 100 или любому из пп. 102-106, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (NCVR), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 83.

108. Выделенный антигенсвязывающий белок по п. 100 или любому из пп. 102-106, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (NCVR), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 55.

109. Выделенный антигенсвязывающий белок по любому из пп. 101-106, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (NCVR), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID

NO: 73.

110. Выделенный антигенсвязывающий белок, который связывается с тем же эпитопом, что и антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41 или антигенсвязывающий белок либо MAGE-A4-специфический CAR по любому из пп. 24-37 и 42-44.

111. Выделенный антигенсвязывающий белок, который конкурирует за связывание с антигенсвязывающим белком по любому из пп. 1-4 и 23, MAGE-A4-специфическим CAR по любому из пп. 5-22 и 38-41 или антигенсвязывающим белком либо MAGE-A4-специфическим CAR по любому из пп. 24-37 и 42-44.

112. Выделенный антигенсвязывающий белок по п. 110 или 111, представляющий собой CAR.

113. Выделенный антигенсвязывающий белок по п. 110 или 111, представляющий собой биспецифическое антитело.

114. Выделенный антигенсвязывающий белок по любому из пп. 111-113, взаимодействующий с аминокислотами 286-294 из SEQ ID NO: 32 или их частью.

115. Выделенный антигенсвязывающий белок по п. 113 или 114, взаимодействующий с CD3.

116. Выделенный антигенсвязывающий белок по любому из пп. 100-115, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую три CDR тяжелой цепи, HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4, 6 и 8 соответственно.

117. Выделенный антигенсвязывающий белок по любому из п. 100 или пп. 102-116, содержащий HCVR, соответствующую другому плечу биспецифического антитела, содержащему три CDR тяжелой цепи, HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 57, 59 и 61 соответственно.

118. Выделенный антигенсвязывающий белок по любому из пп. 101-116, содержащий HCVR, соответствующую другому плечу биспецифического антитела, содержащему три CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 75, 77 и 79 соответственно.

119. Выделенный антигенсвязывающий белок по любому из пп. 100-118, содержащий вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 10, и/или LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 63.

120. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с полипептидом ассоциированного с меланомой антигена A4 (MAGE-A4), причем антитело обладает одной или более из следующих характеристик:

(a) связывается с полипептидом MAGE-A4 с EC50 менее примерно 2×10^{-9} M;

(b) проявляет способность снижать жизнеспособность опухолевых клеток по

сравнению с выделенными рекомбинантными антителами, которые не связываются специфически с полипептидом MAGE-A4; и/или

(с) содержит (i) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, на по меньшей мере примерно 90% идентичную последовательности HCVR, указанной в таблице 1; и (ii) три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, на по меньшей мере примерно 90% идентичную последовательности LCVR, указанной в таблице 1.

121. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 120, причем полипептид MAGE-A4 представляет собой полипептид MAGE-A4, связанный с HLA-A2.

122. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 120 или 121, содержащее HCVR, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 107.

123. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 120-122, содержащее LCVR, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 115.

124. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 120-123, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 2/10, или SEQ ID NO: 83/10, или SEQ ID NO: 107/115.

125. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 120-124, содержащее:

- (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4;
- (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6;
- (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8;
- (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12;
- (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14;

и

- (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16.

126. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 120-124, содержащее:

- (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 109;
- (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 111;
- (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 113;
- (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 117;
- (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14;

и

(f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 119.

127. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 120-126, которое представляет собой антитело IgG1.

128. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 120-126, которое представляет собой антитело IgG4.

129. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 120-128, которое представляет собой биспецифическое антитело.

130. Выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с полипептидом ассоциированного с меланомой антигена A4 (MAGE-A4), и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с полипептидом CD3, причем:

(a) первый антигенсвязывающий домен (A1), который связывается с MAGE-A4, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), при этом

A1-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 109;

A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 111;

A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 113;

A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 117;

A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14;

A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 119; и

(b) второй антигенсвязывающий домен (A2), который связывается с CD3, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3) и три определяющие комплементарность области легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3), причем

A2-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 75;

A2-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 77;

A2-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 61 или SEQ ID NO: 79;

A2-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 117;

A2-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14;

A2-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 119.

131. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 120-130 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

132. Фармацевтическая композиция по п. 131, дополнительно содержащая второй терапевтический агент.

133. Фармацевтическая композиция по п. 132, в которой указанный второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из: противоопухолевого агента, стероидов и средств таргетной терапии.

134. Молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует одну или более HCVR и/или одну или более LCVR антитела по любому из пп. 120-133.

135. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 134.

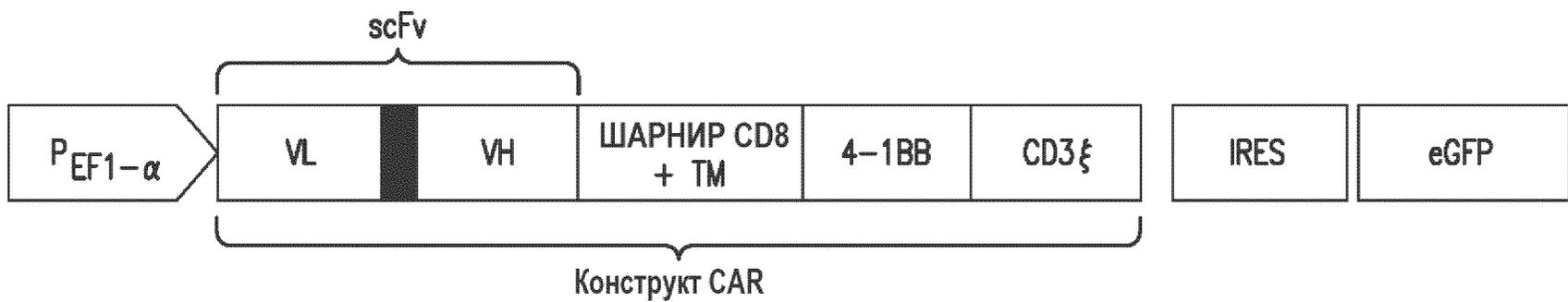
136. Клетка, содержащая вектор по п. 135.

137. Способ лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4, включающий введение субъекту антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 120-130 или фармацевтической композиции по любому из пп. 131-133.

138. Способ по п. 137, в котором указанную фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

139. Способ по п. 138, в котором указанный второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из: противоопухолевого агента, стероидов и средств таргетной терапии.

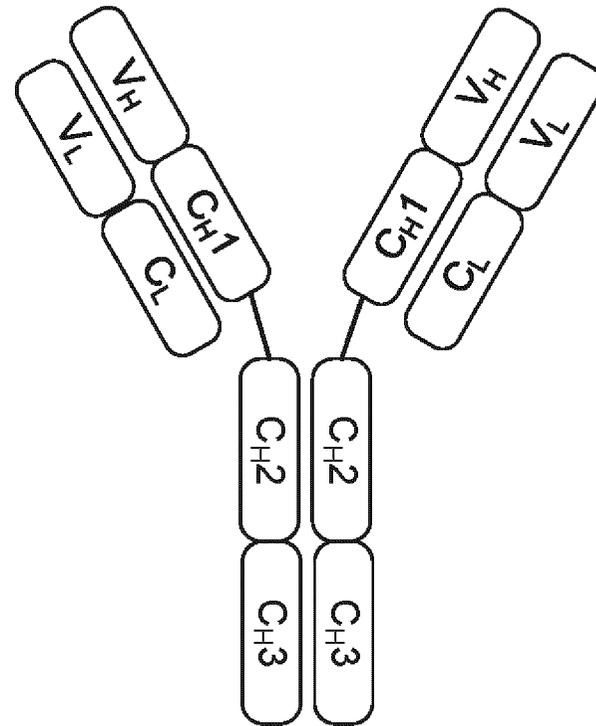
По доверенности



ФИГ. 1

анти-MAGE-A4

анти-CD3



ФИГ. 2