

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490999** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.07.16

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.10.19

(54) **КОМПОЗИЦИИ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ВСМА, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 63/257,822; 63/257,846

(32) 2021.10.20

(33) US

(86) PCT/JP2022/040573

(87) WO 2023/068382 2023.04.27

(88) 2023.07.06

(71) Заявитель:
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:

**Кёрли Майкл, Эрылмаз Эртан,
Дженнингс Шон, Таларико Лизэн,
Хикмен Тэйлор, Вон Кристина Шо
Фэнь, Фрейзер Кэтрин, Ван Хайцин,
Пирсиджилли Алессандра (US)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к связывающим ВСМА молекулам (например, антителам) и конструкциям химерных антигенных рецепторов (CAR), содержащим молекулу, связывающую антиген ВСМА. Связывающие ВСМА молекулы специфически связываются с ВСМА. Представленные ВСМА CAR дополнительно содержат шарнирную область (например, шарнирную область CD28), трансмембранный домен и один или более внутриклеточных сигнальных доменов НК-клеток. НК-клетки, экспрессирующие ВСМА CAR, имеют повышенную эффективность в отношении уничтожения раковых клеток. Также в данном документе предложены терапевтические применения связывающих ВСМА молекул и ВСМА CAR.

A1

202490999

202490999

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580981EA/023

КОМПОЗИЦИИ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ВСМА, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка испрашивает приоритет и преимущество по предварительной заявке США № 63/257822, поданной 20 октября 2021 г.; и предварительной заявке США № 63/257846, поданной 20 октября 2021 г.; содержание каждой из которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[2] Настоящая заявка подана вместе с поданным в электронной форме Перечнем последовательностей в формате XML. Файл перечня последовательностей под названием MIL-019WO1_SL.XML был создан 12 октября 2022 г. и имеет размер 102326 байт; информация в электронном формате Перечня последовательностей в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Антиген созревания В-клеток (также известный как ВСМА, CD269, TNFRSF17), негликозилированный трансмембранный белок типа I, является членом суперсемейства рецепторов некроза опухолей, который преимущественно экспрессируется в дифференцированных плазматических клетках. Было показано, что ВСМА сверхэкспрессируется при различных видах рака, в частности различных видах В-клеточного рака, включая лимфомы, множественную миелому и другие виды рака. Нацеливание на ВСМА стало перспективным подходом к лечению ВСМА-позитивных видов рака, включая лимфомы, множественную миелому и другие виды рака. Наиболее распространенные варианты лечения, направленные на ВСМА, включают ВСМА-специфические антитела (например, конструкции биспецифических антител, включая иммуноонкологическую терапию ViTE® (привлекающий Т-клетки биспецифический активатор)), конъюгаты антитело - лекарственный препарат (ADC) и терапию модифицированными химерными антигенными рецепторами (CAR) иммунными клетками.

[4] Технологии на основе химерных антигенных рецепторов (CAR) предназначены не только для подавления общего иммуносупрессивного микроокружения опухоли, но также для перенаправления иммунных эффекторных клеток на опухолеспецифические антигены клеточной поверхности. CAR искусственно генерируют для экспрессии на иммунных эффекторных клетках в виде трансмембранных рецепторов для идентификации поверхностных антигенов опухолевых клеток.

[5] Естественные клетки-киллеры (NK) являются привлекательными претендентами для конструирования CAR, поскольку они опосредуют эффективную цитотоксичность против опухолевых клеток и, в отличие от Т-клеток, не способны вызывать болезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ) в аллогенных условиях. Таким образом, NK-клетки можно сделать доступными в качестве готового продукта клеточной

терапии для немедленного клинического применения. CAR-NK-клетки также сохраняют присущую им способность распознавать и нацеливаться на опухолевые клетки посредством своих нативных рецепторов, делая уклонение заболевания за счет понижающей регуляции целевого антигена CAR менее вероятным, чем это наблюдается в случае CAR-T клеток.

[6] В настоящем изобретении предложены новые антитела к ВСМА и нацеленные на антиген созревания В-клеток (ВСМА) CAR-NK-клетки, которые способны нацеливаться на антигены ВСМА на раковых клетках за счет оптимизированных конфигураций CAR.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[7] В настоящем изобретении предложены новые антитела к ВСМА человека, их антигенсвязывающие фрагменты и, помимо прочего, новые конструкции ВСМА CAR, содержащие новые ВСМА-связывающие молекулы и экспрессирующие ВСМА-CAR NK-клетки. Также в настоящее изобретение включены способы применения новых ВСМА-связывающих молекул, ВСМА CAR и/или экспрессирующих ВСМА-CAR NK-клеток для лечения видов рака, связанных с аномалиями в ВСМА. Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, и полинуклеотидам, которые кодируют антитела к ВСМА человека, и химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему представленные антитела к ВСМА или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с ВСМА. В частности, настоящее изобретение основано на наблюдении что CAR-NK-клетки, нацеленные на ВСМА, содержащие CAR-содержащий шарнирный домен CD28, неожиданно были более эффективными в мышинных моделях множественной миеломы по сравнению с CAR-NK-клетками, экспрессирующими эквивалентную конструкцию CAR за исключением отличного шарнирного домена (например, IgG1). Таким образом, в настоящем изобретении предложены усовершенствованные конструкции ВСМА-CAR для сигнализации в NK-клетках, обеспечивающие более эффективную иммунотерапию ВСМА-позитивных опухолей.

[8] В одном аспекте настоящего изобретения, предложенного в данном документе, включены антитела к ВСМА человека и их антигенсвязывающие фрагменты; где такие антитела к ВСМА человека и их фрагменты связываются с ВСМА человека с высокой специфичностью и аффинностью.

[9] В некоторых вариантах осуществления представленное антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), где HCDR1 содержит SYAIIH (SEQ ID NO: 2), HCDR2 содержит VTWHDGSKNYAESVMG (SEQ ID NO: 3) и HCDR3 содержит AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4).

[10] В некоторых вариантах осуществления представленное антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с ВСМА с K_D более чем 0 и менее чем 150 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его

антигенсвязывающий фрагмент связывается с ВСМА с K_D более чем 1 пМ и менее чем 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с ВСМА, присутствующим на клетках человека, с EC_{50} от 0,05 до 0,5 мкг/мл.

[11] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три вариабельные области легкой цепи (LCDR), где LCDR2 содержит AASTLQS (SEQ ID NO: 7).

[12] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три вариабельные области легкой цепи (LCDR), где LCDR1 содержит RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11), LCDR2 содержит AASTLQS (SEQ ID NO: 7) и LCDR3 содержит QQLNSYPWT (SEQ ID NO: 14).

[13] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три вариабельные области легкой цепи (LCDR), где LCDR1 содержит RASQGINNYLA (SEQ ID NO: 6), LCDR2 содержит AASTLQS (SEQ ID NO: 7) и LCDR3 содержит QQLKSYPT (SEQ ID NO: 8).

[14] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три вариабельные области легкой цепи (LCDR), где LCDR1 содержит RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11), LCDR2 содержит AASTLQS (SEQ ID NO: 7) и LCDR3 содержит QQLNSYPFT (SEQ ID NO: 12).

[15] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело, содержащее константную область IgG.

[16] В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие три LCDR, где

LCDR1 содержит RASQGIX₁X₂YLA (SEQ ID NO: 79),

LCDR2 содержит AASTLQS (SEQ ID NO: 7) и/или

LCDR3 содержит QQLX₃SYPX₄T (SEQ ID NO: 80);

где X₁ выбран из S или N;

X₂ выбран из S или N;

X₃ выбран из N или K; и/или

X₄ выбран из F или W.

[17] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH, содержащую SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH,

по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 9.

[18] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 5, 10 или 13. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 5, 10 или 13.

[19] В некоторых вариантах осуществления связывающий антиген ВСМА фрагмент выбран из группы, состоящей из антитела IgA, антитела IgG, антитела IgE, антитела IgM, би- или мультиспецифического антитела, фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fd', фрагмента Fd, выделенных CDR или их наборов; одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), слияния полипептид-Fc, однодоменного антитела, антитела верблюжьих; маскированного антитела, малых модульных иммунофармацевтических средств («SMIPs™»), одиночной цепи, тандемного диатела, VHH, антикалина, нанотела, минител, BiTE, белка анкиринового повтора, DARPIN, авимера, DART, TCR-подобного антитела, аднектина, аффилина, транстела; аффитела, TrimerX, MicroProtein, финомера, центирина; и KALBITOR.

[20] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или антигенсвязывающий фрагмент содержит линкерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или антигенсвязывающий фрагмент содержит линкер, выбранный из SEQ ID NO: 15-18. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или антигенсвязывающий фрагмент содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv с SEQ ID NO: 85-87. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичный SEQ ID NO: 85-87.

[21] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В качестве неограничивающих примеров антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), где HCDR1 содержит SYAIIH (SEQ ID

NO: 2), HCDR2 содержит VTWHDGSNKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3) и HCDR3 содержит AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4). В других примерах антитело против ВСМА или его фрагмент может содержать определяющую комплементарность область варибельной области легкой цепи (LCDR) 2, содержащую AASTLQS (SEQ ID NO: 7).

[22] В качестве неограничивающего примера представленное антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три HCDR, включая HCDR1, содержащую SYAIH (SEQ ID NO: 2), HCDR2, содержащую VTWHDGSNKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3), и HCDR3, содержащую AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4), и три LCDR, включая LCDR1, содержащую RASQGINNYLA (SEQ ID NO: 6), LCDR2, содержащую AASTLQS (SEQ ID NO: 7), и LCDR3, содержащую QQLKSYPT (SEQ ID NO: 8).

[23] В одном варианте осуществления представленное антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три HCDR, включая HCDR1, содержащую SYAIH (SEQ ID NO: 2), HCDR2, содержащую VTWHDGSNKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3), и HCDR3, содержащую AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4), и три LCDR, включая LCDR1, содержащую RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11), LCDR2, содержащую AASTLQS (SEQ ID NO: 7), и LCDR3, содержащую QQLNSYPWT (SEQ ID NO: 14).

[24] В другом варианте осуществления представленное антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три HCDR, включая HCDR1, содержащую SYAIH (SEQ ID NO: 2), HCDR2, содержащую VTWHDGSNKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3), и HCDR3, содержащую AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4), и три LCDR, включая LCDR1, содержащую RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11), LCDR2, содержащую AASTLQS (SEQ ID NO: 7), и LCDR3, содержащую QQLNSYPPT (SEQ ID NO: 12).

[25] В другом аспекте настоящего изобретения предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный ВСМА-связывающий домен, шарнирную область CD28, трансмембранный домен и один или более внутриклеточных сигнальных доменов, где ВСМА-связывающий домен содержит антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе. Соответственно, описанный в данном документе ВСМА-связывающий CAR распознает и специфически связывает антиген ВСМА.

[26] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, который кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий связывающий антиген ВСМА домен, шарнирную область CD28, трансмембранный домен и один или более внутриклеточных сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид может содержать по меньшей мере одну модификацию.

[27] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует связывающий антиген ВСМА домен, содержащий: (а) определяющую комплементарность область варибельной области тяжелой цепи (HCDR) 1, содержащую SEQ ID NO: 2, (b) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 3, и (c) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 4.

[28] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит

последовательность, которая кодирует связывающий антиген ВСМА домен, содержащий: (а) определяющую комплементарность область вариабельной области легкой цепи (LCDR) 1, содержащую SEQ ID NO: 6, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 7, и (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует связывающий антиген ВСМА домен, содержащий: (а) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 11, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 7, и (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует связывающий антиген ВСМА домен, содержащий: (а) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 11, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 7, и (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 14.

[29] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует связывающий антиген ВСМА домен, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или 9. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует связывающий антиген ВСМА домен, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 5, 10 или 13.

[30] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из: фрагмента Fab, фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fv или одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления VH и VL scFv соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит от около 50 аминокислот до около 2 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 15-18.

[31] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует ВСМА-связывающий CAR, который связывается с ВСМА с K_D менее чем около 1×10^{-6} М, менее чем около 1×10^{-7} М, менее чем около 1×10^{-8} М или менее чем около 1×10^{-9} М.

[32] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен. Трансмембранный домен представленного ВСМА-связывающего CAR представляет собой трансмембранный домен CD28, CD3 ζ , CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28.

[33] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую шарнирную область. Шарнирная область представленного ВСМА-связывающего CAR представляет собой шарнирный домен CD28. В качестве неограничивающего примера шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 36.

[34] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую костимулирующую область. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая область представляет собой сигнальную область CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белка запрограммированной гибели 1 (PD-1), индуцибельного костимулятора Т-клеток (ICOS), CD8 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член 14 суперсемейства факторов некроза опухолей; TNFSF1.4), NKG2C, Ig альфа (CD79a), Fc-гамма-рецептора, молекулы ГКГС класс I, белков рецепторов TNF, иммуноглобулин-подобных белков, рецепторов цитокинов, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, рецептора лиганда Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFRR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD 19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, 11.2 бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, ITGAE, CD103, ITGAL, LFA-1, ITGAM, ITGAX, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD 19a, лиганда, который специфически связывается с CD83, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая область содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 28.

[35] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую домен активации. В качестве неограничивающего примера домен активации представляет собой домен CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления домен активации содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 30.

[36] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно содержит последовательность, кодирующую суицидальный ген. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит суицидальный ген, выбранный из ритуксимаба, i-каспазы 9, тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-tk) и ганцикловира, ацикловира или FIAU; оксидоредуктазы и циклогексимида; цитозиндезаминазы и 5-фторцитозина; тимидинкиназы тимидилаткиназы (Tdk::Tmk). В некоторых вариантах осуществления суицидальный ген представляет собой i-каспазу 9.

[37] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно содержит последовательность, кодирующую цитокин. В некоторых вариантах осуществления цитокин выбран из IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 или IL-21. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-15. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность IL-15 содержит SEQ ID NO: 23.

[38] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе ВСМА-связывающий CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 19-21.

[39] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает вектор, содержащий полинуклеотид по любому из предшествующих вариантов осуществления.

[40] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор, ДНК-вектор, плазмиду, РНК-вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вектор, лентивирусный вектор или любую их комбинацию.

[41] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клетка, экспрессирующая описанный в данном документе ВСМА-связывающий CAR. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая CAR клетка содержит полинуклеотид, который кодирует описанный в данном документе ВСМА-связывающий CAR. В других вариантах осуществления экспрессирующая CAR клетка содержит описанный в данном документе вектор.

[42] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой NK-клетку, Т-клетку или опухоль-инфильтрирующий лимфоцит (ОИЛ), iNKT-клетки, В-клетки, макрофаги, дендритные клетки или их смесь. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к популяции иммунных клеток, содержащей иммунную клетку по любому из вышеприведенных вариантов осуществления.

[43] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей полинуклеотид по любому из вышеприведенных вариантов осуществления, вектор по любому из вышеприведенных вариантов осуществления, CAR

по любому из вышеприведенных вариантов осуществления или клетку по любому из вышеприведенных вариантов осуществления.

[44] В качестве неограничивающего примера настоящее изобретение относится к НК-клетке, содержащей полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий: (a) антигенсвязывающую молекулу, специфически связывающуюся с ВСМА, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH), по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или 9, и переменную область легкой цепи (VL), по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 5, 10 или 13, (b) шарнирную область CD28, (c) трансмембранный домен и (d) один или более внутриклеточных сигнальных доменов.

[45] В некоторых аспектах настоящее изобретение включает полинуклеотид, кодирующий ВСМА-связывающий CAR, содержащий: (a) шарнирную область CD28, (b) трансмембранный домен, (c) костимулирующий домен и (d) цитокин IL-15.

[46] В одном аспекте настоящее изобретение включает иммунную клетку, содержащую полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит: (a) антигенсвязывающий домен; (b) шарнирную область CD28; и (c) трансмембранный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка содержит CAR, связывающийся с ВСМА, экспрессируемым на опухолевых клетках.

[47] В другом аспекте настоящего изобретения предложены способы применения антител к ВСМА, их антигенсвязывающих фрагментов, ВСМА-связывающих CAR, векторов, клеток и композиций, описанных в данном документе.

[48] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения рака у индивида с помощью антитела к ВСМА, его антигенсвязывающего фрагмента, ВСМА-связывающего CAR, полинуклеотида, вектора и/или клетки, экспрессирующей ВСМА-связывающий CAR; где способ включает этап введения индивиду терапевтически эффективного количества любых из антител, CAR, полинуклеотидов, векторов, клеток и композиций, обсуждаемых в настоящем изобретении.

[49] В некоторых вариантах осуществления представленный способ дополнительно включает этап назначения индивиду эффективного количества дополнительной терапии.

[50] В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия включает хирургическое вмешательство, лучевую терапию, генную терапию, иммунотерапию или гормональную терапию.

[51] В некоторых вариантах осуществления клетки, содержащие полинуклеотид, или клетки, содержащие вектор, вводят индивиду путем инфузии, инъекции, внутривенно, внутриартериально, внутрибрюшинно, интратекально, интратуморально, внутримышечно, эндоскопично, внутриочагово, интракраниально, чрескожно, подкожно, местно, путем

перфузии, в опухолевое микроокружение или любой их комбинации.

[52] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой злокачественное образование из иммунных клеток, например, лейкоз, лимфому или миелому. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из множественной миеломы, лимфомы и/или лейкоза.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[53] Следует отметить, что различные компоненты, проиллюстрированные на этих и других фигурах, предназначены исключительно в целях иллюстрации, и их не следует интерпретировать как часть формулы изобретения, если явно не указано иное.

[54] **На Фиг. 1** приведена схематическая конструкция типового ВСМА-CAR с цитокином IL-15 (например, растворимым IL-15) и шарнирной областью из CD28.

[55] **На Фиг. 2** приведен график *in vitro* анализа цитотоксичности НК-клеток, трансдуцированных ВСМА CAR с шарнирной областью IgG и шарнирной областью CD28, по сравнению с нетрансдуцированными (NT) клетками.

[56] **На Фиг. 3** приведено иллюстративное изображение прогрессирования опухоли в совместно вводимых НК-клетках, экспрессирующих ВСМА-CAR с шарнирной областью IgG или шарнирным доменом CD28.

[57] **На Фиг. 4** приведено иллюстративное изображение прогрессирования опухоли с разными совместно вводимыми НК-клетками, экспрессирующими ВСМА-CAR (1 М или 3 М) с шарнирным доменом CD28.

[58] **На Фиг. 5** приведено иллюстративное изображение разных совместно вводимых НК-клеток, экспрессирующих ВСМА-CAR (1 М) с шарнирным доменом CD28.

[59] **На Фиг. 6** приведено иллюстративное изображение НК-клеток, экспрессирующих ВСМА-CAR, вводимых в концентрации 1 М или 3 М, через один день после инокуляции опухолевых клеток MM1S («отсроченное на 1 день введение»); нетрансдуцированных НК-клеток в качестве контроля (NT-НК).

[60] **На Фиг. 7** приведена кривая выживаемости Каплана - Майера для мышей, которым вводили НК-клетки, экспрессирующие ВСМА-CAR, вводимые в дозировке 1 миллион или 3 миллиона, через один день после инокуляции опухолевых клеток MM1s («отсроченное на 1 день введение»).

[61] **На Фиг. 8** приведено изображение слайда гистопатологического анализа легких мышей, полученных после *in vivo* обработки 10 миллионами НК-клеток, содержащих ВСМА-CAR.

[62] **На Фиг. 9А** приведен график, иллюстрирующий секрецию IL-15 в плазме у мышей при отсроченном на 1 день введении. **На Фиг. 9В** приведен график, иллюстрирующий секрецию IL-15 в плазме у мышей при отсроченном на 9 дней введении. **На Фиг. 9С** приведен график, иллюстрирующий пролиферацию CAR-НК-клеток в крови мышей при отсроченном на 9 дней введении дозы. **На Фиг. 9D** приведен график, иллюстрирующий пролиферацию CAR-НК-клеток в крови мышей при отсроченном на 1 день введении дозы.

[63] **На Фиг. 10А** приведен график, иллюстрирующий уничтожение линии опухолевых клеток после обработки при разных соотношениях эффектор:мишень (Э:М) ВСМА-CART-клетками, содержащими шарнирную область CD28 или шарнирную область IgG, по сравнению с C11D5.3VLVH-Fc. **На Фиг. 10В** приведен график, иллюстрирующий % каспазы+клеток-мишеней MM1s как маркера апоптоза после обработки при разных соотношениях Э:М ВСМА-CART-клетками, содержащими шарнирную область CD28 или шарнирную область IgG. **На Фиг. 10С** приведен график, иллюстрирующий % митохондриального повреждения ВСМА-экспрессирующих опухолевых клеток MM1s после обработки при разных соотношениях Э:М ВСМА-CART-клетками, содержащими шарнирную область CD28 или шарнирную область IgG.

[64] . **На Фиг. 11А-В** приведено графическое представление *in vitro* цитотоксичности с ВСМА28-1 и ВСМА28-2 CAR-содержащими НК-клетками, соответственно, в присутствии или отсутствие 800 нг/мл растворимого ВСМА. **На Фиг. 11С** приведено графическое представление *in vitro* цитотоксичности с положительным контролем C11D5.3Fc в присутствии или отсутствие 800 нг/мл растворимого ВСМА.

[65] **На Фиг. 12** приведены графики, иллюстрирующие флуктуации массы у мышей, обработанных ВСМА CAR NK в дозе 10 М, которым вводили дозу через 9 дней после инокуляции опухолевых клеток («отсроченная 9 дней доза») (**Фиг. 12А**) и которым вводили дозу через 1 день после инокуляции опухолевых клеток («отсроченная 1 день доза») (**Фиг. 12В**).

[66] **На Фиг. 13** приведены репрезентативные изображения выживаемости мышей, которым инокулировали экспрессирующие люциферазу опухолевые клетки MM и которые затем получили одну (10 М x1) или две дозы (10 М x2) ВСМА28-2-экспрессирующих CAR-NK-клеток.

[67] **На Фиг. 14** проиллюстрирована *in vitro* активность уничтожения конструкции ВСМА28-2 CAR, содержащей НК-клетки, полученные от 4 независимых доноров пуповинной крови (CBU), против нескольких линий опухолевых клеток. **На Фиг. 14А** проиллюстрирована *in vitro* активность уничтожения конструкции ВСМА28-2, содержащей CAR-NK-клетки, в клетках MM1s (ВСМА^{низк.}) для 4 независимых доноров CBU в сравнении с эквивалентными нетрансдуцированными (UTD) НК-клетками. **На Фиг. 14В** проиллюстрирована *in vitro* активность уничтожения конструкции ВСМА28-2, содержащей CAR-NK-клетки, в клетках JN3 (ВСМА КО) для 4 независимых доноров в сравнении с эквивалентными нетрансдуцированными (UTD) НК-клетками. **На Фиг. 14С** проиллюстрирована *in vitro* активность уничтожения конструкции ВСМА28-2, содержащей CAR-NK-клетки, в клетках RPMI-8226 (ВСМА^{выс.}) для 4 независимых доноров CBU в сравнении с эквивалентными нетрансдуцированными (UTD) НК-клетками. **На Фиг. 14D** проиллюстрирована *in vitro* активность уничтожения конструкции ВСМА28-2, содержащей CAR-NK-клетки, в родительских клетках JIN (ВСМА^{средн.}) для 4 независимых доноров CBU в сравнении с эквивалентными нетрансдуцированными (UTD) НК-клетками.

[68] **На Фиг. 15A и 15B** проиллюстрирована повторная оценка противоопухолевой активности уничтожения ВСМА28-2, экспрессирующей CAR-NK-клетки, в опухолевой модели MM1S *in vitro* после нескольких раундов добавления опухолевых клеток.

[69] **На Фиг. 16** проиллюстрирована *in vivo* эффективность конструкций ВСМА28-2 против опухоли RPMI-8226.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[70] В соответствии со сложившейся конвенцией патентного права, слова в единственном числе, используемые в настоящем описании в сочетании со словом содержащий, включая формулу изобретения, обозначают один или более чем один (т. е. по меньшей мере, один) грамматический объект. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более одного элемента. Некоторые варианты осуществления изобретения могут состоять из или состоять преимущественно из одного или более элементов, технологических этапов и/или способов по изобретению. Подразумевается, что любые способ или композицию, описанные в данном документе, можно реализовать в отношении любых других способа или композиции, описанных в данном документе, и что можно комбинировать разные варианты осуществления.

[71] В тексте данного описания, если контекст не подразумевает иное, слова «содержать», «содержит» и «содержащий» следует понимать как подразумевающие включение указанных этапа или элемента или группы этапов или элементов, но не исключение любых других этапа или элемента или группы этапов или элементов. Выражение «состоящий из» означает включающий и ограничено тем, что следует за фразой «состоящий из». Таким образом, выражение «состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными и что другие элементы присутствовать не могут. Выражение «состоящий преимущественно из» означает включение любых элементов, перечисленных после этого выражения и ограничено другими элементами, которые не препятствуют или не способствуют активности или действию, указанным в описании для перечисленных элементов. Таким образом, выражение «состоящий преимущественно из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, но другие элементы являются необязательными и могут присутствовать или нет в зависимости от того, влияют ли они на активность или действие перечисленных элементов или нет.

[72] В тексте этого описания отсылка к «одному варианту осуществления», «варианту осуществления», «конкретному варианту осуществления», «родственному варианту осуществления», «определенному варианту осуществления», «дополнительному варианту осуществления» или «еще одному варианту осуществления» или их комбинациям означает, что конкретные признак, структура или характеристика, описанные в связи с этим вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, вышеприведенные выражения в различных местах этого описания не обязательно всегда относятся к одному

и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики можно комбинировать любым подходящим в одном или более вариантах осуществления.

[73] В контексте данного документа термины «или» и «и/или» используют для описания множества компонентов в комбинации или за исключение друг друга. Например, «x, y и/или z» может относиться только к «x», только к «y», только к «z», к «x, y и z», к «(x и y) или z», к «x или (y и z)» или к «x, или y, или z». В частности подразумевается, что x, y или z могут быть явным образом исключены из варианта осуществления.

[74] В тексте этой заявки термин «около» используют в соответствии с его прямым и общепринятым значением в области клеточной и молекулярной биологии для указания того, что значение включает стандартное отклонение или стандартную погрешность прибора или способа, применяемых для определения этого значения.

[75] *Аффинность*: В контексте данного документа термин «аффинность» относится к характеристикам связывающего взаимодействия между связывающим фрагментом (например, антигенсвязывающим фрагментом (например, варибельным доменом, описанным в данном документе) и/или связывающим Fc-рецептор фрагментом (например, FcRn-связывающим фрагментом, описанным в данном документе)) и мишенью (например, антигеном (например, ВСМА) и/или FcR (например, FcRn)) и указывает на силу связывающего взаимодействия. В некоторых вариантах осуществления меру аффинности выражают в виде константы диссоциации (K_D). В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент имеет высокую аффинность в отношении мишени (например, K_D менее чем около 10^{-7} М, менее чем около 10^{-8} М, менее чем около 10^{-9} М, менее чем около 10^{-10} , менее чем около 10^{-10} , менее чем около 10^{-11} , менее чем около 10^{-12}). В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент имеет низкую аффинность в отношении мишени (например, K_D более чем около 10^{-7} М, более чем около 10^{-6} М, более чем около 10^{-5} М или более чем около 10^{-4} М). В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент имеет высокую аффинность в отношении мишени при первом рН, имеет низкую аффинность в отношении мишени при втором рН и имеет среднюю аффинность в отношении мишени при уровне рН между первым рН и вторым рН.

[76] *Приблизительно или около*: В контексте данного документа термин «приблизительно» или «около» применительно к одному или более представляющим интерес значениям относится к значению, которое является схожим с установленным эталонным значением. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100% от возможного значения).

[77] *Антитело*: В контексте данного документа термин «антитело» относится к

полипептиду, который содержит по меньшей мере одну переменную область иммуноглобулина, например, аминокислотную последовательность, которая обеспечивает переменный домен иммуноглобулина или последовательность переменного домена иммуноглобулина. Например, антитело может содержать переменную область тяжелой (H) цепи (сокращенно называемую в данном документе VH) и переменную область легкой (L) цепи (сокращенно называемую в данном документе VL). В другом примере антитело содержит две переменные области тяжелой (H) цепи и две переменные области легкой (L) цепи. Термин «антитело» включает антигенсвязывающие фрагменты антител (например, одноцепочечные антитела, фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd, Fv и dAb), а также полные антитела, например, интактные иммуноглобулины типов IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также их подтипов). Легкие цепи иммуноглобулинов могут относиться к типам каппа или лямбда.

[78] *Антигенсвязывающий фрагмент* или *фрагмент антитела* относится к части интактного антитела. Антигенсвязывающий фрагмент или фрагмент антитела относится к части интактного антитела, которая связывается с антигеном (например, BCMA). Антигенсвязывающий фрагмент может содержать определяющие антигенность переменные области интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются этим, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, линейные антитела, миметики антител, scFv и одноцепочечные антитела.

[79] *Связывающий фрагмент*: В контексте данного документа «связывающий фрагмент» представляет собой любую молекулу или часть молекулы, способную специфически связываться с мишенью, например представляющей интерес мишенью (например, антигеном (например, BCMA) и/или FcR (например, FcRn)). Связывающий фрагменты включают, например, антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, их Fc-области или Fc-фрагменты, миметики антител, пептиды и аптамеры.

[80] *BCMA*: В контексте данного документа термин «BCMA» относится к антигену созревания В-клеток. Белок BCMA человека состоит из 184 аминокислот: 1-54: внеклеточный домен; 55-77: трансмембранный домен; 78-184: цитоплазматический домен. Аминокислотная последовательность BCMA содержит:

MLQMGQCSONEYFDSLHACIPCOLRCSSNTPPLTCORYCNASVTNSVKGTNA
 ILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKISSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIPLP
 RGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATE
 IEKSISAR (SEQ ID NO: 22), последовательность внеклеточного домена подчеркнута.)

В BCMA отсутствует сигнальный пептид и он напоминает другие рецепторы, такие как рецептор BAFF, трансмембранный активатор, партнер лиганда циклофилина и кальциевый модулятор (TACI). Эти рецепторы могут играть роль в созревании В-клеток и их дифференцировке в плазматические клетки. Их лиганды включают BAFF и APRIL, экспрессия которых повышена у пациентов с MM. BCMA представляет собой рецептор клеточной поверхности, также известный как CD269 и член 17 суперсемейства рецепторов факторов некроза опухолей (TNFRSF17), который кодируется геном TNFRSF17. Этот

рецептор экспрессируется в основном в зрелых В-лимфоцитах и в большинстве случаев множественной миеломы (ММ).

[81] *Определяющая комплементарность область (CDR)*: «CDR» варибельного домена представляет собой аминокислотные остатки в варибельной области, идентифицированные в соответствии с определениями Kabat, Chothia, совокупностью определений Kabat и Chothia, AbM, контактными и/или конформационными определениями или любым методом определения CDR, хорошо известным в данной области техники. CDR антитела можно идентифицировать как гиперварибельные области, изначально определенные Kabat et al. Смотрите, например, Kabat et al., 1992, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Позиции CDR также можно идентифицировать как структурные петли, изначально описанные Chothia и другими. Смотрите, например, Chothia et al., *Nature* 342:877-883, 1989. Другие подходы к идентификации CDR включают «определение AbM», которое является компромиссным вариантом между определениями Kabat и Chothia и разработано с использованием программного обеспечения для моделирования антител от Oxford Molecular's AbM (в настоящее время Accelrys®), или «контактное определение» CDR на основании наблюдаемых антигенных контактов, приведенное в MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 262:732-745, 1996. В другом подходе, называемом в данном документе «конформационным определением» CDR, позиции CDR можно идентифицировать как остатки, которые обеспечивают энтальпический вклад в связывание антигена. Смотрите, например, Makabe et al., *Journal of Biological Chemistry*, 283: 1156-1166, 2008. Другие определения границ CDR могут не строго следовать одному из вышеуказанных подходов, но тем не менее будут перекрываться по меньшей мере с частью CDR по Kabat, хотя они могут быть укорочены или удлинены с учетом прогнозных или экспериментальных данных о том, что определенные остатки или группы остатков или даже целые CDR существенно не влияют на связывание антигена. В контексте данного документа CDR может относиться к CDR, определенным любым подходом, известным в данной области техники, включая комбинации подходов. В способах, используемых в данном документе, могут применяться CDR в соответствии с любым из этих подходов. В случае любого заданного варианта осуществления, включающего более одной CDR, CDR могут быть определены в соответствии с любыми из определений Kabat, Chothia, расширенного, AbM, контактного и/или конформационного.

[82] *Химерный антигенный рецептор (CAR)*: Химерная молекула, которая содержит антигенсвязывающую часть (такая как антитело против ВСМА) и сигнальный домен, такой как сигнальный домен Т-клеточного рецептора (например, CD3 ζ). Как правило, CAR состоит из антигенсвязывающего фрагмента, трансмембранного домена и эндодомена. Эндодомен, как правило, содержит сигнальную цепь, имеющую иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), такую как CD3 ζ или Fc ϵ RI γ . В некоторых случаях эндодомен дополнительно содержит внутриклеточную часть по меньшей мере одного дополнительного костимулирующего домена, такого как CD28

и/или CD137.

[83] *Константная область*: В контексте данного документа термин «константная область» относится к полипептиду, который соответствует одной или более константным областям иммуноглобулиновых доменов антитела или получен из них. Константная область может содержать любой или все из следующих иммуноглобулиновых доменов: домен СН1, шарнирную область, домен СН2, домен СН3 (полученные из IgA, IgD, IgG, IgE или IgM) и домен СН4 (полученный из IgE или IgM).

[84] *Сконструированный*: В контексте данного документа термин «сконструированный» относится к компоненту, созданному руками человека, включая клетку, нуклеиновую кислоту, полипептид, вектор и т. д. По меньшей мере в некоторых случаях сконструированный компонент является синтетическим и содержит элементы, которые в природе не присутствуют или не имеют такой конфигурации, в которой их используют в изобретении.

[85] *Эпитоп*: В контексте данного документа «эпитоп» представляет собой термин в данной области техники и относится к локализованной области антигена, с которой может специфически связываться антитело. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп), или эпитоп может, например, представлять собой объединенные две или более несмежные области полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). В некоторых вариантах осуществления эпитоп, с которым связывается антитело, можно определить, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, рентгеновских кристаллографических исследований, анализов ELISA, масс-спектрометрии с использованием водородно-дейтериевого обмена (например, жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии с электрораспылением), матричных анализов олигопептидного сканирования и/или картирования мутагенеза (например, картирования сайт-направленного мутагенеза). В случае рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно осуществлять, используя любой из известных в данной области техники способов (например, Giege R et al, (1994) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50(Pt 4) : 339-350; McPherson A (1990) Eur J Biochem 189: 1-23; Chayen NE (1997) Structure 5 : 1269-1274; McPherson A (1976) J Biol Chem 251 : 6300-6303). Антитело: кристаллы антигенов можно исследовать с помощью хорошо известных методов дифракции рентгеновских лучей и уточнять с помощью компьютерного программного обеспечения, известного в данной области техники, например, Refmac and Phenix. Исследования на основе картирования мутагенеза можно проводить, используя любой способ, известный специалистам в данной области техники. Описание способов исследования мутагенеза, включая способы исследования на основе аланин-сканирующего мутагенеза, смотрите, например, в Champe M et al, (1995) J Biol Chem 270: 1388- 1394 and Cunningham BC & Wells JA (1989) Science 244: 1081-1085.

[86] *Fc-область*: В контексте данного документа термин «Fc-область» относится к димеру из двух «Fc-полипептидов», где каждый «Fc-полипептид» содержит константную

область антитела за исключением первого константного домена иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления «Fc-область» содержит два Fc-полипептид, связанных одной или более дисульфидными связями, химическими линкерами или пептидными линкерами. «Fc-полипептид» относится к двум последним доменам константной области иммуноглобулина IgA, IgD и IgG и к трем последним доменам константной области иммуноглобулина IgE и IgM, и также может включать гибкую шарнирную область, расположенную N-терминально относительно этих доменов. В случае IgG «Fc-полипептид» содержит иммуноглобулиновые домены Сгамма2 (C γ 2) и Сгамма3 (C γ 3) и нижнюю часть шарнирной области между Сгамма1 (C γ 1) и C γ 2. Хотя границы Fc-полипептида могут варьироваться, Fc-полипептид тяжелой цепи IgG человека обычно содержит по определению остатки, начиная с T223 или C226, или P230 до карбокси-конца, где нумерация соответствует индексу EU по Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Services, Springfield, VA). В случае IgA «Fc-полипептид» содержит иммуноглобулиновые домены Сальфа2 (C α 2) и Сальфа3 (C α 3) и нижнюю часть шарнирной области между Сальфа1 (C α 1) и C α 2. Fc-область может быть синтетической, рекомбинантной или созданной из природных источников, таких как IVIG.

[87] *Выделенный*: В контексте данного документа термин «выделенный» относится к молекулам, или биологическим препаратам, или клеточному материалу, которые практически не содержат другие материалы. В одном аспекте термин «выделенный» относится к нуклеиновой кислоте, такой как ДНК или РНК, или белку или полипептиду, или клетке или клеточной органелле, или ткани или органу, отделенным от других ДНК или РНК, или белков или полипептидов, или клеток или клеточных органелл, или тканей или органов, соответственно, например присутствующих в природном источнике. Термин «выделенный» также относится к нуклеиновой кислоте или пептиду, которые практически не содержат клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды в случае получения методом рекомбинантных ДНК, или химических предшественников или других химических веществ в случае химического синтеза. Кроме того, подразумевается, что «выделенная нуклеиновая кислота» содержит фрагменты нуклеиновых кислот, которые не встречаются в природе в виде фрагментов и не были бы обнаружены в естественном состоянии. Термин «выделенный» также используют в данном документе в отношении полипептидов, которые отделены от других клеточных белков, и подразумевается, что он включает как очищенные, так и рекомбинантные полипептиды. Термин «выделенный» также используют в данном документе в отношении клеток или тканей, которые отделены от других клеток или тканей, и подразумевается, что он включает как культивируемые, так и сконструированные клетки и ткани.

[88] K_a : В контексте данного документа « K_a » относится к скорости ассоциации конкретного связывающего фрагмента и мишени при образовании комплекса связывающий фрагмент/мишень.

[89] K_d : В контексте данного документа « K_d » относится к скорости диссоциации комплекса конкретный связывающий фрагмент/мишень.

[90] K_D : В контексте данного документа « K_D » в контексте данного документа относится к константе диссоциации, которую получают из соотношения K_d и K_a (т. е. K_d/K_a) и выражают как молярную концентрацию (М). Значения K_D можно определять, используя способы, общепринятые в данной области техники, например, используя поверхностный плазмонный резонанс или используя биосенсорную систему, такую как система Biacore®.

[91] *Естественные клетки-киллеры*: Естественные клетки-киллеры или НК-клетки представляют собой вид цитотоксических лимфоцитов, критически важных для врожденной иммунной системы. Роль НК-клеток аналогична роли цитотоксических Т-клеток адаптивного иммунного ответа позвоночных. НК-клетки обеспечивают быстрые ответы на инфицированные вирусом клетки, действуя около 3 дней после инфицирования, а также отвечают на образование опухолей.

[92] *Процент идентичности*: В контексте данного документа «процент идентичности» и аналогичные выражения между двумя последовательностями является функцией числа идентичных позиций между последовательностями (., % идентичности = $\frac{\text{число идентичных позиций}}{\text{общее число позиций}} \times 100$, с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Также при определении степени идентичности последовательности между двумя аминокислотными последовательностями специалист может учитывать так называемые «консервативные» аминокислотные замены, которые в общем случае можно описать как аминокислотные замены, в которых аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком со сходной химической структурой и который практически или по существу не влияет на функцию, активность или другие биологические свойства полипептида. Такие консервативные аминокислотные замены хорошо известны в данной области техники, например, из WO 04/037999, GB-A-2 357 768, WO 98/49185, WO 00/46383 и WO 01/09300; а (предпочтительные) типы и/или комбинации таких замен можно выбирать на основании соответствующей информации из WO 04/037999, а также WO 98/49185, и из дополнительных ссылок, цитируемых в данном документе.

[93] *Предотвращать*: В контексте данного документа «предотвращать» и аналогичные слова, такие как «предотвращенный», «предотвращение» и т. д., указывают на подход, направленный на предотвращение, ингибирование или снижение вероятности появления или повторного появления заболевания или патологического состояния, например, рака. Этот термин также относится к отсрочке начала или повторного появления заболевания или патологического состояния или отсрочке появления или повторного появления симптомов заболевания или патологического состояния. В контексте данного документа «предотвращение» и аналогичные слова также включают снижение интенсивности, действия, симптомов и/или нагрузки заболевания или

патологического состояния до начала или повторного появления заболевания или патологического состояния.

[94] *Образец*: В контексте данного документа термин «образец» в общем случае относится к биологическому образцу. Образец можно брать из ткани или клеток человека. В некоторых примерах образец может включать тканевую биопсию, кровь (например, цельную кровь), плазму крови, внеклеточную жидкость, высушенные пятна крови, культивируемые клетки, отбракованную ткань или быть получен из них. Образец можно выделять из источника перед сбором. Неограничивающие примеры включают кровь, цереброспинальную жидкость, плевральную жидкость, амниотическую жидкость, лимфатическую жидкость, слюну, мочу, кал, слезы, пот или слизистые выделения, а также другие биологические жидкости, выделенные из первичного источника перед сбором. В некоторых примерах образец выделяют из первичного источника (клеток, тканей, физиологических жидкостей, таких как кровь, образцов окружающей среды и т. д.) во время приготовления образцов. Образец может быть очищен или иным образом обогащен из своего первичного источника или нет. В некоторых случаях первичный образец гомогенизируют перед последующей обработкой. Образец можно фильтровать или центрифугировать для удаления лейкоцитарной пленки, липидов или частиц. Образец также можно очищать или обогащать в отношении нуклеиновых кислот или можно обрабатывать РНКазами. Образец может содержать ткани или клетки, которые являются интактными, фрагментированными или частично разложенными.

[95] *Одноцепочечный переменный фрагмент (scFv)*: В контексте данного документа термин «одноцепочечный переменный фрагмент» или «scFv» относится к слитому белку из переменных областей тяжелой (V_H) и легкой цепей (V_L) иммуноглобулина (например, мышинового или человеческого), ковалентно связанных с образованием гетеродимера $V_H::V_L$. Тяжелая (V_H) и легкая цепи (V_L) соединены напрямую или соединены пептид-кодирующим линкером (например, из 10, 15, 20, 25 аминокислот), который соединяет N-конец V_H с C-концом V_L или C-конец V_H с N-концом V_L . Обычно линкер является богатым глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости. Линкер может связывать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. Неограничивающие примеры линкеров описаны в Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008) и WO 2014/087010, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

[96] *Субъект*: В контексте данного документа термин «субъект» в общем случае относится к индивиду, имеющему биологический образец, который подвергают обработке или анализу, и, в конкретных случаях, имеет или предположительно имеет рак. Субъект может представлять собой любой организм или любое животное, являющиеся объектом способа или материала, включая млекопитающих, например, человека, лабораторных животных (например, приматов (таких как обезьяна, мартышка, орангутанг или шимпанзе), крыс, мышей, кроликов), домашний скот (например, коров, овец, коз, свиней,

индеек и кур), домашних животных (например, собак, кошек и грызунов), лошадей и трансгенных отличных от человека животных. Субъект может представлять собой пациента, например, имеющего или предположительно имеющего заболевание (что может называться медицинским состоянием), такое как доброкачественное или злокачественное новообразование или рак. Субъект может проходить или уже пройти лечение. Субъект может быть бессимптомным. Субъект может представлять собой здорового индивида, для которого предотвращение рака является желательным. Термин «индивид» можно использовать взаимозаменяемо, по меньшей мере в некоторых случаях. В контексте данного документа «субъект» или «индивид» могут быть помещены в медицинское учреждение или нет и могут проходить амбулаторное лечение за пределами медицинского учреждения. Индивид может получать одну или более медицинских композиций через интернет. Индивид может представлять собой человека или отличное от человека животное любого возраста и, следовательно, включает как взрослых, так и подростков (детей) и младенцев, и включает внутриутробно развивающихся индивидов. Не предполагается, что этот термин означает необходимость медицинского лечения, поэтому индивид может добровольно или недобровольно участвовать в экспериментах, как клинических, так и в поддержку фундаментальных научных исследований.

[97] *Мишень*: В контексте данного документа «мишень» представляет собой любую молекулу, специфически связываемую связывающим фрагментом антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой антиген, описанный в данном документе (например, ВСМА). В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой FcR (например, FcRn). Термины «первая мишень» и «вторая мишень» используют в данном документе для обозначения молекул двух разных молекулярных видов, а не двух молекул одного молекулярного вида. Например, в некоторых вариантах осуществления первая мишень представляет собой сывороточный белок, а вторая мишень представляет собой FcRn.

[98] *Терапевтически эффективное количество*: В контексте данного документа термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству терапевтической молекулы (например, антитела к ВСМА, описанного в данном документе), которое обеспечивает терапевтический эффект при лечении субъекта при разумном соотношении польза/риск применимо к любому медицинскому лечению. Терапевтический эффект может быть объективным (т. е. измеряемым по какому-либо тесту или маркеру) или субъективным (т. е. субъект дает понять об эффекте или чувствует его). В частности, «терапевтически эффективное количество» означает количество терапевтической молекулы или композиции, эффективное для лечения, облегчения или предотвращения конкретного заболевания или патологического состояния или для оказания выявляемого терапевтического или профилактического эффекта, например, путем облегчения симптомов, связанных с заболеванием, предотвращения или отсрочки начала заболевания и/или также уменьшения тяжести или частоты симптомов заболевания. Терапевтически эффективное количество можно вводить по схеме введения

доз, которая может включать несколько единичных доз. Для любой конкретной терапевтической молекулы терапевтически эффективное количество (и/или соответствующая единичная доза в рамках эффективной схемы введения доз) может варьироваться, например, в зависимости от пути введения, от комбинации с другими фармацевтическими агентами. Также конкретное терапевтически эффективное количество (и/или единичная доза) для любого конкретного субъекта может зависеть от ряда факторов, включая нарушение, которое лечат, и тяжесть нарушения; активность конкретного применяемого фармацевтического агента; конкретную применяемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион субъекта; время введения, путь введения и/или скорость выведения или метаболизма конкретной применяемой терапевтической молекулы; продолжительность лечения; и подобные факторы, как хорошо известно в области медицины.

[99] *Лечение*: В контексте данного документа термин «лечение» включает любой благоприятное или необходимое воздействие на симптомы или патологию заболевания или патологического состояния, и может включать даже минимальное снижение одного или более измеряемых маркеров заболевания или патологического состояния, которое лечат, например, рака. Лечение может включать, необязательно, либо уменьшение или облегчение симптомов заболевания или патологического состояния, либо замедление прогрессирования заболевания или патологического состояния. «Лечение» не обязательно означает полное искоренение или излечение заболевания или патологического состояния, или связанных с ним симптомов. В качестве неограничивающих примеров лечение может относиться к любому введению терапевтической молекулы (например, антител к ВСМА и ВСМА-связывающих CAR, описанных в данном документе), которая частично или полностью уменьшает, смягчает, облегчает, подавляет, задерживает начало, снижает тяжесть и/или снижает частоту возникновения одного или более симптомов или признаков конкретного заболевания, нарушения и/или патологического состояния, например, ВСМА-позитивных видов рака. В некоторых случаях лечение может относиться к субъекту, не демонстрирующему признаки соответствующего заболевания, нарушения и/или патологического состояния, и/или субъекту, демонстрирующему только ранние признаки заболевания, нарушения и/или патологического состояния. В альтернативном или дополнительном варианте такое лечение может относиться к субъекту, который демонстрирует один или более установленных признаков соответствующего заболевания, нарушения и/или патологического состояния.

[100] *Опухолевый антиген*: В контексте данного документа «опухолевый антиген» означает биологическую молекулу, имеющую антигенность, экспрессия которой вызывает рак.

[101] Любой способ в контексте терапевтических, диагностических или физиологических цели или эффекта может быть также описан в формулировке «применения», такой как «применение» любых соединения, композиции или агента, описанных в данном документе, для достижения или реализации описанных

терапевтических, диагностических или физиологических цели или эффекта.

АНТИТЕЛА

[102] Настоящее изобретение основано частично на открытии сконструированных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые демонстрируют связывание с ВСМА (например, ВСМА человека). ВСМА представляет собой белок с одним трансмембранным доменом, цитоплазматическим С-концом и внеклеточным N-концом. ВСМА преимущественно экспрессируется зрелыми В-лимфоцитами, а его сверхэкспрессия и активация связаны с повышенной экспрессией генов, критически важных для выживания, роста, адгезии, активации остеокластов, ангиогенеза, метастазирования и иммуносупрессии. Имеются данные об экспрессии ВСМА в различных гематологических злокачественных образованиях, что позволяет предположить, что ВСМА может играть важную роль как биомаркер или терапевтическая мишень при этих заболеваниях.

[103] Антитела к ВСМА, описанные в данном документе, разработаны для связывания с ВСМА. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела к ВСМА и их фрагменты связываются с ВСМА человека. В определенных вариантах осуществления ВСМА человека содержит или состоит из аминокислотной последовательности с референтным номером Uniprot: Q02223 (SEQ ID NO: 22) или ее фрагмента. SEQ ID NO: 22 приведена ниже:

MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA
ILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILP
RGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATE
IEKSISAR (SEQ ID NO: 22)

[104] В определенных вариантах осуществления антитела к ВСМА и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, связываются с внеклеточным доменом ВСМА. В определенных вариантах осуществления антитела к ВСМА и их антигенсвязывающие фрагменты связываются с внеклеточным доменом ВСМА человека. В определенных вариантах осуществления внеклеточный домен ВСМА человека содержит или состоит из аминокислот от 1 до 54 из SEQ ID NO: 22.

[105] В определенных вариантах осуществления белок ВСМА содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или по меньшей мере на около 100% идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 22, или ее фрагменту.

[106] Описанное в данном документе антитело против ВСМА может представлять собой иммуноглобулин, антитело на основе тяжелой цепи, антитело на основе легкой цепи, антитело на основе LRR или другой белковый остов с подобными антителу свойствами, а также другой иммунологический связывающий фрагмент, известный в

данной области техники, включая, например, Fab, Fab', Fab'2, Fab₂, Fab₃, F(ab')₂, Fd, Fv, Feb, scFv, SMIP, антитело, диатело, триатело, тетратело, минитело, tandab, DVD, BiTe, TandAb и т. п. или любую их комбинацию. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации разных классов антител известны в данной области техники.

[107] Антитело может представлять собой молекулу иммуноглобулина из четырех полипептидных цепей, например, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей. Тяжелая цепь может содержать переменный домен тяжелой цепи и константный домен тяжелой цепи. Константный домен тяжелой цепи может содержать CH1, шарнирную область, области CH2, CH3 и, в некоторых случаях, CH4. Подходящую константную область тяжелой цепи можно получить из любого иммуноглобулина (например, IgA, IgG или IgE). В некоторых вариантах осуществления подходящую константную область тяжелой цепи можно получить из IgG1, IgG2 или IgG4. В конкретных вариантах осуществления подходящая константная область тяжелой цепи получена из IgG1. Легкая цепь может содержать переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. Константный домен легкой цепи может содержать легкую цепь каппа или легкую цепь лямбда. Переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, как правило, можно дополнительно подразделить на области переменности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждый из таких переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи может содержать три CDR и четыре каркасные области, расположенные от amino-конца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, одна или более из которых могут быть сконструированы, как описано в данном документе. Отнесение аминокислот для каждого домена соответствует определениям Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)) или Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989). В контексте данного документа CDR относятся к каждой из тяжелой (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и легкой (LCDR1, LCDR2, LCDR3) цепей.

[108] Варианты осуществления изобретения включают антитела, содержащие CDR, встречающиеся в описанных в данном документе доменах vH и vL, которые идентифицированы с использованием традиционных систем нумерации, таких как системы нумерации IMGT, Kabat и Chothia. Такие системы нумерации хорошо известны в данной области техники.

Переменная область тяжелой цепи

[109] В некоторых вариантах осуществления антитела к ВСМА или их фрагменты, описанные в данном документе, содержат общую переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит последовательности определяющей комплементарности области (CDR) переменной области тяжелой цепи (VH):

vHCDR1: SYAIH (SEQ ID NO: 2)

vHCDR2: VTWHDGSNKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3)

vHCDR3: AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4)

[110] В определенных вариантах осуществления CDR идентифицированы в соответствии с системой нумерации Kabat.

[111] В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи (VH) содержит аминокислотную последовательность QITLRESGGDVVQPGRSLRLSACAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVAVTWHDGSNKYYAESVMGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAEDTGVYYCARAKFGEPQYFQHWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1).

[112] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с:

QITLRESGGDVVQPGRSLRLSACAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVAVTWHDGSNKYYAESVMGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAEDTGVYYCARAKFGEPQYFQHWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 54).

[113] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 54, и в то же время содержит одну или более из последовательностей vH CDR1, vHCDR2 и/или vHCDR3, описанных в данном документе.

[114] В некоторых вариантах осуществления сконструированные антитела содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на около 70%, 75%, 80% (например, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95%) идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1. Например, VH содержит аминокислотную последовательность, которая является на около 80%, на около 81%, на около 82%, на около 83%, на около 84%, на около 85%, на около 86%, на около 87%, на около 88%, на около 89%, на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98%, на около 99% или на около 100% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит не более чем 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19,

18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 1.

[115] В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи антитела к ВСМА кодируется полинуклеотидом, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты:

сagatcactttaaggagagcggaggcgatgtggtgcagcccggtcgttctttaagactgagctgtgccgccagcggcttcacc
ttcagcagctacgccatccactgggtgagacaagctcccggtaaaggtttagagtgggtggctgtgacttggcagcagcggctccaacaagt
actatgccgagagcgtgatgggtcgtttaccatctctcgtgacaacagcaagaacactttatattacacatgaactctttaagggccgagga
caccggcgtgtactactgcgccagagccaagttcggcgagccccagtaactccagcactggggccaaggtfacactggtgaccgtgtccag
с (SEQ ID NO: 55)

[116] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела к ВСМА кодируется полинуклеотидом, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 56:

сagatcactttaaggagagcggaggcgatgtggtgcagcccggtcgttctttaagactgagctgtgccgccagcggcttcacc
ttcagcagctacgccatccactgggtgagacaagctcccggtaaaggtttagagtgggtggctgtgacttggcagcagcggctccaacaagt
actatgccgagagcgtgatgggtcgtttaccatctctcgtgacaacagcaagaacactttatattacacatgaactctttaagggccgagga
caccggcgtgtactactgcgccagagccaagttcggcgagccccagtaactccagcactggggccaaggtfacactggtgaccgtgtccag
cgctagcaccaggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcacctctgggggacagcggccctgggtgcctggctca
aggactactccccgaaccgggtgacggtgtcgtggaactcagggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtctacagtctc
aggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacactacatctgcaacgtgaatcacaagcccag
саacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcactgaactcctggggg
gaccgtcagtcttcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtgggtggactgag
ccacgaagaccctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcgaggagcagtac
aacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaa
gccctcccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtataccctgccccatcccggg
aggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaaggtctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggg
cagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctccttctctatagcaagctcaccgtggacaagagc
aggtggcagcaggggaacgtctctcatgctccgtgatgatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcccgtccccgg
gt (SEQ ID NO: 56)

[117] В некоторых вариантах осуществления сконструированные антитела содержат тяжелую цепь, которая кодируется полинуклеотидом, имеющим последовательность нуклеиновой кислоты, идентичную SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, содержащее не более чем 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 54.

[118] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА кодируется полинуклеотидом, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей

мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9, и в то же время содержит одну или более из последовательностей vHCDR1, vHCDR2 и/или vHCDR3, описанных в данном документе.

[119] В некоторых вариантах осуществления антитела к ВСМА или их фрагменты, описанные в данном документе, содержат общую вариабельную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит последовательности определяющей комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (VH):

vHCDR1: SYAIH (SEQ ID NO: 2)

vHCDR2: VTWHDGSNKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3)

vHCDR3: AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4)

[120] В определенных вариантах осуществления CDR идентифицированы в соответствии с системой нумерации Kabat.

[121] В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVAVTWHDGSNKYYAESVMGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTGVYYCARAKFGEPQYFQHWGQGT TTVTSS (SEQ ID NO: 9).

[122] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с:

EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVAVTWHDGSNKYYAESVMGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTGVYYCARAKFGEPQYFQHWGQGT TVTVSSASTKGPSVFLPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 57).

[123] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 57, и в то же время содержит одну или более из последовательностей vHCDR1, vHCDR2 и/или vHCDR3, описанных в данном документе.

[124] В некоторых вариантах осуществления сконструированные антитела содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную SEQ ID NO: 57. В определенных вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на около 70% (например, по

меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95%) идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 9. Например, VH содержит аминокислотную последовательность, которая является на около 70%, 75%, 80%, на около 81%, на около 82%, на около 83%, на около 84%, на около 85%, на около 86%, на около 87%, на около 88%, на около 89%, на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98%, на около 99% или на около 100% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит не более чем 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 9.

[125] В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи антитела к ВСМА кодируется полинуклеотидом, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты:

gaggtgcagttagtggagagcggagggcagatgtggtgcagcccggctcgttcttaagactgagctgtgccgccagcggcttcac
cttcagcagctacgccatccactgggtgagacaagctcccggtaaagggttagagtggtggctgtgacttggcacgacggctccaacaag
tactatgccgagagcgtgatgggtcgtttaccatctctcgtgacaacagcaagaacactttatattacacatgaactctttaagggccgagg
acaccggcgtgactactgcgccagagccaagttcggcgagccccagctactccagcactggggccaaggtacaaccgtgaccgtgtcc
agc (SEQ ID NO: 58)

[126] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий антитело против ВСМА, содержит последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с:

gaggtgcagttagtggagagcggagggcagatgtggtgcagcccggctcgttcttaagactgagctgtgccgccagcggcttcac
cttcagcagctacgccatccactgggtgagacaagctcccggtaaagggttagagtggtggctgtgacttggcacgacggctccaacaag
tactatgccgagagcgtgatgggtcgtttaccatctctcgtgacaacagcaagaacactttatattacacatgaactctttaagggccgagg
acaccggcgtgactactgcgccagagccaagttcggcgagccccagctactccagcactggggccaaggtacaaccgtgaccgtgtcc
agcgtgacaccaaggggccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcactctgggggcacagcggccctgggctgctgtgt
caaggactactccccgaaccggtgacgggtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtctacagtc
ctcaggactctactcctcagcagcgtgtgaccgtgcctccagcagcttgggcccagacctacatctgcaactgaaatcacaagccc
agcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcactgaaactcctgggg
ggaccgtcagcttctcttcccccaaaaacccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtga
gccacgaagacctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcccggaggagcagta
caacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaaca
agccctcccagccccatcgagaaaacctctccaagccaagggcagccccgagaaccacaggtgtataccctgccccatcccgg
gaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgcaaggtctctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgg
gcagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtggacaagag
caggtggcagcaggggaactctctctatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccg
ggt (SEQ ID NO: 59)

[127] В некоторых вариантах осуществления сконструированные антитела содержат последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи, идентичную SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, содержащее не более чем 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 9.

[128] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА кодируется полинуклеотидом, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 59, и в то же время содержит одну или более из последовательностей ν HCDR1, ν HCDR2 и/или ν HCDR3, описанных в данном документе.

Таблица 1. CDR вариабельной области легкой цепи и V_H антитела к ВСМА

Ab #	VH	SEQ ID NO:	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
1	QITLRESGGDVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYAIHWVR QAPGKGLEWVAVTWHHDG SNKYAAESVMGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTG VYYCARAKFGEFPQYFQHW GQGTLLVTVSS	1	SYAIIH	2	VTWHDGSNKYYAE SVMG	3	AKFGEFPQYFQH	4
Последовательность нуклеиновой кислоты								
1	cagatcaactttaaggagagagcggaggcg atggtgtgcagccggctgtctttaagac tggctgtgccccagcggcttcaccttc aggactaccccatccactgtgggtgagac aagctcccgtaaaaggfttagagtggtg gctgtgacttggcaccatccctcccaacaa gtactatgccagagccgtgatggctgftt caccatctctgtgacaacagcaagaaca ctttattttacacatgaactctttaaggcc gaggacaccggcgtgtactactgcgcca gagccaaagtcggcggcccagctacttc cagcactggggcccaaggctacactggtga ccgtgtccagc	55	agctacgc cateccac	60	gtgacttggcagcagcggctcca acaagctactatgccgagagcgt gatgggt	61	gccaagtcggcggacc ccagctacttccagcac	62
2	QITLRESGGDVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYAIHWVR QAPGKGLEWVAVTWHHDG SNKYAAESVMGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTG VYYCARAKFGEFPQYFQHW GQGTLLVTVSS	1	SYAIIH	2	VTWHDGSNKYYAE SVMG	3	AKFGEFPQYFQH	4
Последовательность нуклеиновой кислоты								

2	cagatcactttaagggagagcggagggc atggtgfcagcccggfcttcttaagac fgagctfgcccagccggcttcaccttc agcagctaccccaccacifggtgagac aagctcccggfamaaggtttagagigtggtg gctgtagcttggcagacggctcccaaca gtaactatgcccagagagcgtgtagtgcgtt caccatctctcggacacaaagcaagaaca ctttatattacacatgaaactttaaaggcc gagagacaccggcgtgtaactactgcgcca gagcccaatctcggcggagcccagctacttc cagcactgggggccaaaggttacacfgtga ccggtgtccagc	55	agctacgc catccac	60	gfgactggcacgacggctcca acaagtaactatgcccgaagcgt gatgggt	61	gccaagttcggcgagcc ccaagtacttccagcac	62
3	EVQLVESGGDVVQPGRS RLSCAASGFTFSSYAHWV RQAPGKGLEWVAVTWHD GSNKYYAESVMGRFTISR NSKNTLYLHMNSLR AEDT GVYYCARAKFGEPQYFQH WGQGTTVTVSS	9	SYAIIH	2	VTWHDGSKNYAE SVMG	3	AKFGEPQYFQH	4
Последовательность нуклеиновой кислоты								
3	gaggtgcagttagtgagagagcggaggc gatggtgagcccggctcgttcttlaaga ctgagctgcccagccggcttcacctt cagcagctacggccatccactggtgaga caagctcccggfmaaggttttagagtggtg ggctgtagctggcacgacggctccaac aagtaactatgcccagagcgtgtagtgcg tttcaccatctctgfgacacagcaagaa cactttatttacacatgaacttttaagg ccgagggacacagcggctgtaactactgcg cagagccaagttcggcggagcccagctac	58	Agctacgc catccac	60	gfgactggcacgacggctcca acaagtaactatgcccgaagcgt gatgggt	61	gccaagttcggcgagcc ccaagtacttccagcac	62
	tccagcactggggcccaggtfacaaccgt gaccggtgtccagc							

[129] Как будет понятно специалистам в данной области техники, любую такую последовательность CDR тяжелой цепи можно легко комбинировать, например, с помощью методик молекулярной биологии, с любыми другими последовательностями или доменами антител, приведенными в данном документе или известными в данной области техники, включая любые каркасные области, CDR или константные домены, или

их части, описанные в данном документе или иным образом известные в данной области техники, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте любого формата, описанного в данном документе или известного в данной области техники.

[130] В различных сконструированных антителах, описанных в данном документе, константный домен тяжелой цепи может относиться к любому классу (или подклассу). В различных сконструированных антителах, описанных в данном документе, константный домен тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность любого из одного или более из IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, включая такие подклассы, как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. В различных вариантах осуществления константный домен сконструированных антител, описанных в данном документе, может содержать смесь двух или более классов (или подклассов) константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина. Например, антитело против ВСМА может содержать первую часть константного домена, которая имеет последовательность константного домена иммуноглобулина, выбранного из константного домена класса IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, и вторую часть константного домена, которая имеет последовательность константного домена иммуноглобулина, отличную от первой и выбранную из константного домена класса IgG, IgM, IgA, IgD или IgE. В некоторых случаях константный домен антитела к ВСМА, описанного в данном документе, может содержать смесь двух или более подклассов определенного класса константного домена, например, первая часть константного домена имеет последовательность константного домена иммуноглобулина, выбранного из константного домена подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, а вторая часть константного домена имеет последовательность константного домена иммуноглобулина, отличную от первой и выбранную из константного домена подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых конкретных вариантах осуществления константный домен содержит весь или часть константного домена IgG2 и весь или часть константного домена IgG4.

[131] В некоторых случаях антитело против ВСМА содержит константную область антитела, Fc-область или Fc-фрагмент, которые демонстрируют измененное связывание (по сравнению с эталонной константной областью) с одним или более Fc-рецепторами (например, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIV или FcRn-рецептором). В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит константную область антитела, Fc-область или Fc-фрагмент, которые демонстрируют сниженное связывание (по сравнению с эталонной константной областью) с одним или более Fcγ-рецепторами (например, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIV). В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела, которые демонстрируют повышенное связывание с FcRn-рецептором (по сравнению с эталонной константной областью) при сывороточном pH и/или при внутриклеточном pH.

[132] Например, антитело против ВСМА может содержать константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, сконструированные так, чтобы содержать

добавление, делецию или замену одного или более аминокислотных остатков 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436 (нумерация Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH)). Не ограничиваясь теорией, считается, что одна или более из этих аминокислот константной области, Fc-области или Fc-фрагмента опосредуют взаимодействие с Fc-рецептором, например FcRn. В некоторых вариантах осуществления одна или более из этих описанных аминокислот заменены гистидином, аргинином, лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, серином, треонином, аспарагином или глутамином. В некоторых вариантах осуществления отличный от гистидина остаток заменен остатком гистидина. В некоторых вариантах осуществления остаток гистидина заменен отличным от гистидина остатком.

[133] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие аминокислотные замены в одной или более из позиций 308, 309, 311, 312 и 314. В некоторых вариантах осуществления замены в одной или более из позиций 308, 309, 311, 312 и 314 представляют собой замены треонином, пролином, серином, аспарагиновой кислотой и лейцином, соответственно. В некоторых вариантах осуществления остатки в одной или более из позиций 308, 309 и 311 замещены изолейцином, пролином и глутаминовой кислотой, соответственно. В других вариантах осуществления остатки в одной или более из позиций 308, 309, 311, 312 и 314 замещены треонином, пролином, серином, аспарагиновой кислотой и лейцином, соответственно.

[134] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие аминокислотные замены в одной или более из позиций 251, 252, 254, 255 и 256, конкретнее, имеющие замены в одной или более из этих позиций. В некоторых вариантах осуществления остаток 251 замещен лейцином или аргинином, остаток 252 замещен лейцином, тирозином, фенилаланином, серином, триптофаном или треонином, остаток 254 замещен треонином или серином, остаток 255 замещен лейцином, глицином, изолейцином или аргинином и/или остаток 256 замещен серином, фенилаланином, аргинином, глутамином, глутаминовой кислотой, аспарагиновой кислотой, аланином, аспарагином или треонином. В некоторых вариантах осуществления остаток 251 замещен лейцином, остаток 252 замещен тирозином или лейцином, остаток 254 замещен треонином или серином и/или остаток 255 замещен аргинином. В других вариантах осуществления остаток 252 замещен фенилаланином и/или остаток 256 замещен аспарагиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления остаток 251 замещен лейцином, остаток 252 замещен тирозином, остаток 254 замещен треонином или серином и/или остаток 255 замещен аргинином.

[135] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие аминокислотные замены в одной или более из позиций 428, 433, 434, 435 и 436, конкретнее, имеющие замены в одной или более из этих позиций. В некоторых вариантах

осуществления остаток 428 замещен метионином, треонином, лейцином, фенилаланином или серином, остаток 433 замещен лизином, аргинином, серином, изолейцином, пролином, глутамином или гистидином, остаток 434 замещен фенилаланином, тирозином или гистидином, остаток 435 замещен тирозином и/или остаток 436 замещен гистидином, аспарагином, аргинином, треонином, лизином, метионином или треонином. В некоторых вариантах осуществления остатки в одной или более из позиций 433, 434, 435 и 436 замещены лизином, фенилаланином, тирозином и гистидином, соответственно. В некоторых вариантах осуществления остаток 428 замещен метионином и/или остаток 434 замещен тирозином.

[136] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие аминокислотные замены в одной или более из позиций 385, 386, 387 и 389, конкретнее, имеющие замены в одной или более из этих позиций. В некоторых вариантах осуществления остаток 385 замещен аргинином, аспарагиновой кислотой, серином, треонином, гистидином, лизином или аланином, остаток 386 замещен треонином, пролином, аспарагиновой кислотой, серином, лизином, аргинином, изолейцином или метионином, остаток 387 замещен аргинином, гистидином, серином, треонином, аланином или пролином и/или остаток 389 замещен пролином или серином. В некоторых вариантах осуществления остатки в одной или более из позиций 385, 386, 387 и 389 замещены аргинином, треонином, аргинином и пролином, соответственно. В некоторых вариантах осуществления остатки в одной или более из позиций 385, 386 и 389 замещены аспарагиновой кислотой, пролином и серином, соответственно.

[137] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие одну или более из следующих замен: лейцин в остатке 251, тирозин или лейцин в остатке 252, треонин или серин в остатке 254, аргинин в остатке 255, треонин в остатке 308, пролин в остатке 309, серин в остатке 311, аспарагиновая кислота в остатке 312, лейцин в остатке 314, аргинин в остатке 385, треонин в остатке 386, аргинин в остатке 387, пролин в остатке 389, метионин в остатке 428, лизин в остатке 433, фенилаланин или тирозин в остатке 434, тирозин в позиции 435 и/или тирозин в позиции 436. Дополнительные аминокислотные замены, которые могут быть включены в константную область, Fc-область или Fc-фрагмент, включают те, которые описаны, например, в патентах США №№ 6277375; 8012476 и 8163881.

[138] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА, описанное в данном документе, содержит константный домен тяжелой цепи, который содержит мутацию Ala-Ala, описанную, например, в публикациях РСТ №№ WO 94/28027 и WO 98/47531; и Xu et al. (2000) *Cell Immunol* 200:16-26. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА с одной или более мутациями в константной области тяжелой цепи, включая мутацию Ala-Ala, имеет сниженную эффекторную функцию. В соответствии с этими вариантами осуществления константная область

антитела к ВСМА, описанного в данном документе, может содержать замену на аланин в позиции 234 и/или мутацию на аланин в позиции 235 (нумерация EU).

[139] Как будет понятно специалистам в данной области техники, любую такую последовательность константного домена тяжелой цепи можно легко комбинировать, например, с помощью методик молекулярной биологии, с любыми другими последовательностями или доменами антител, приведенными в данном документе или известными в данной области техники, включая любые каркасные области, CDR или константные домены, или их части, описанные в данном документе или иным образом известные в данной области техники, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте любого формата, описанного в данном документе или известного в данной области техники.

Вариабельная область легкой цепи

[140] Также предложены антитела к ВСМА или их фрагменты, содержащие различные указанные последовательности в одной или более переменных областях легкой цепи, включая определяющие комплементарность области легкой цепи LCDR1-3. В различных вариантах осуществления молекулы с указанными переменными областями легкой цепи приведены с последовательностями тяжелой цепи, обсуждаемыми выше. В определенных вариантах осуществления CDR идентифицированы в соответствии с системой нумерации Kabat.

[141] Таким образом, в настоящем изобретении предложены антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область легкой цепи с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11) (LCDR1), AASTLQS (SEQ ID NO: 7) (LCDR2) и QQLNSYPWT (SEQ ID NO: 14) (LCDR3).

[142] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область легкой цепи с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RASQGINNYLA (SEQ ID NO: 6) (LCDR1), AASTLQS (SEQ ID NO: 7) (LCDR2) и QQLKSYPT (SEQ ID NO: 8) (LCDR3).

[143] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область легкой цепи с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11) (LCDR1), AASTLQS (SEQ ID NO: 7) (LCDR2) и QQLNSYPFT (SEQ ID NO: 12) (LCDR3).

[144] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменные области легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 10 или 13.

[145] В некоторых примерах в настоящем изобретении предложены антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности

определяющих комплементарность областей (CDR) варибельной области тяжелой цепи SYAIH (SEQ ID NO: 2) (HCDR1), VTWHDGSKYKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3) (HCDR2) и AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4) (HCDR3) и варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11) (LCDR1), AASTLQS (SEQ ID NO: 7) (LCDR2) и QQLNSYPWT (SEQ ID NO: 14) (LCDR3).

[146] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) варибельной области тяжелой цепи SYAIH (SEQ ID NO: 2) (HCDR1), VTWHDGSKYKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3) (HCDR2) и AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4) (HCDR3) и варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RASQGINNYLA (SEQ ID NO: 6) (LCDR1), AASTLQS (SEQ ID NO: 7) (LCDR2) и QQLKSYPT (SEQ ID NO: 8) (LCDR3).

[147] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) варибельной области тяжелой цепи SYAIH (SEQ ID NO: 2) (HCDR1), VTWHDGSKYKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3) (HCDR2) и AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4) (HCDR3) и варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11) (LCDR1), AASTLQS (SEQ ID NO: 7) (LCDR2) и QQLNSYPPT (SEQ ID NO: 12) (LCDR3).

[148] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% идентичной SEQ ID NO: 5; и варибельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% идентичной SEQ ID NO: 1.

[149] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% идентичной SEQ ID NO: 10; и варибельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% идентичной SEQ ID NO: 9.

[150] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% идентичной SEQ ID NO: 13; и

вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% идентичной SEQ ID NO: 1.

[151] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи (VL) и/или LCDR с аминокислотными последовательностями, приведенными в **таблице 2**.

Таблица 2. CDR вариабельной области легкой цепи и VL антитела к ВСМА

Антитело №	VL	SEQ ID NO:	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
1	DIVMTQSPSFLSASVGDRTITCR ASQGISSYLAWYQQKPKAPKLLI YAASITLQSGVPSRFRSGSGTEFT LTISLQPEDFATYYCQQLNSYPW TFGQGTKVDIK	13	RASQGISS YLA	11	AASTLQ S	7	QQLNSYP WT	14
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ								
1	gacatcgtgatgacccagagccccagctttctgagc gcaagcgtggcgatcgtgaccatcacttgcgtg ccagccaaaggtatcagcagctatttagcttggtaaca gcagaagcccgagcaagcccccaagctgctgatct acggcccaagcacitttacagagccggcgtgccccttc gttttctggcagcggctctggccaccggatcactttaa ccatcagctcttttacagcccgagagcttccaccat tactgccaagcagctgaactcctacccttggagccttcg gccaaggtaccacaaggtggacatcaag	63	cgtgcccagccaa ggatcagcagc tatttagc	64	gcccagc actttacaga gc	65	cagcagctgaac tcctacccttgg cc	66
2	DIVMTQSPSFLSASVGDRTITCR ASQGINNYLAWYQQKPGIAPKLLI YAASITLQSGVPSRFRSGSGTEFT LTISLQPEDFATYYCQQLKSYPT FGPGTKVEIK	5	RASQGINN YLA	6	AASTLQ S	7	QQLKSYPF T	8
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ								
2	gacatcgtgatgacccagagccccagctttttaagcg ccagcgtggcgacagaggtgaccatcacttgcgtg ccagccaaaggtatcacaactatttagcttggtaacca gcagaagcccggtatcggcccccaagctgctgatcta cggcccaagcacactgcagagccggcgtgcccctaga gatttctggcagcggctctggccaccagagttcacttta accatcagctcttttacagccccgagagcttccaccct	67	cgtgcccagccaa ggatcacaact atttagct	68	gcccagc acaactgcaag agc	69	cagcagctgaag agctacccttca cc	70

	actactgcccacacactgaaagagctaccctccaccct cggccccggcaccacaaggctgagatcaag								
3	DIVMTQSPSFLSASVGDRTVITCR ASQGISSYLAWYQQKPKAPKLLI YAASITLQSGVPSRFRFSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYCQQQLNSYPFT FGPGTKVDIK	10	RASQGISS YLA	11	AASTLQ S	7	QQQLNSYPF T	12	
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ									
3	gacategtgatgaccceagagcccctagcttttaa gcccagccgctggggccgacagagtgaccact tctctgcccaccccaaggctatcagcagctatftag cttggtaaccagcaagagcccggcaagggcccc aaggctgctgatctatagcccagcagcactttacaga gcccagtgccctagcagatfcagcggcagcggc tcccaccgagttcacttaaccatcagctctt acagcccagggacttcgccacctactactgcca gagctgaacagctacccttacccttggccc cggcaccacaaggggacatcaag	71	cgtgccagcca aggtatcagca gctatttagc	64	ggccagag cactttaca gagc	65	cagcagctgaa cagctaccctt cacc	72	

[152] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, 10 или 13.

[153] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит

аминокислотную последовательность вариabельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, 10 или 13, и в то же время содержит одну или более из последовательностей vLCDR1, vLCDR2 и/или vLCDR3, описанных в данном документе.

[154] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 73, 74 или 75.

[155] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 73:

DIVMTQSPSFLSASVGDRVITICRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPWTFGQGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 73).

[156] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 74:

DIVMTQSPSFLSASVGDRVITICRASQGINNYLAWYQQKPGIAPKLLIYAASLQSGVPSRFRGGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLKSYPTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 74).

[157] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 75:

DIVMTQSPSFLSASVGDRVITICRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[158] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 73, 74 или 75, и в то же время содержит одну или более из последовательностей vLCDR1, vLCDR2 и/или vLCDR3, описанных в данном документе.

[159] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его

фрагмент содержит аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи (VL), идентичную SEQ ID NO: 5, 10 и 13. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит не более чем 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 5, 10 и 13.

[160] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 76-78. В некоторых вариантах осуществления сконструированные антитела содержат последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи, идентичную SEQ ID NO: 76-78.

[161] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 76:

gacatcgtgatgaccagagccccagctttctgagcgccagcgtggcgatcgttgaccatcacttgcgtgccagccaaggt
atcagcagctatttagcttggtagcagcagaagcccggaaggcccccaagctgctgatctacgccgccagcactttacagagcggcgtg
ccttctcgttttctggcagcggctctggcaccgagttcactttaaccatcagctctttacagcccaggacttcgccacctactgcccagca
gctgaactcctacccttggaccttcggccaaggtaccaaggtggacatcaagcgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttccgccatc
tgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataa
cgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctg
agcaaacgagactacgagaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacag
gggagagtgt (SEQ ID NO: 76)

[162] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 77,

gacatcgtgatgaccagagccctagcttttaagcgccagcgtggcgacagagtgaccatcacttgcgtgccagccaaggt
atcaacaactatttagcttggtagcagcagaagcccggtatcgccccaagctgctgatctacgccgccagcacactgcagagcggcgtgc
ctagcagatttggtagcagcggctctggcacagagttcactttaaccatcagctctttacagcccaggacttcgccacctactactgccagc
agctgaagagctacccttcaccttcggccccggcaccgaaggtggagatcaagcgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttccgcc
tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggat
aacgcctccaatcgggtaactcccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgc
tgagcaaacgagactacgagaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaac
aggggagagtgt (SEQ ID NO: 77)

[163] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 78:

gacatcgtgatgaccagagccctagcttttaagcgccagcgtggcgacagagtgaccatcacttgcgtgccagccaaggt

atcagcagctatttagcttggtagaccagcagaagccccggcaaggcccccaagctgctgatctacgccgccagcactttacagagcggagtg
 cctagcagattcagcggcagcggctccggcaccgagttcactttaaccatcagctctttacagcccaggacttcgccactactactgcca
 gcagctgaacagctaccccttcaccttcggccccggcaccagggtggacatcaagcgtacgggtgctgacctctgtcttcatctcccgc
 catctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtgg
 ataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgac
 gctgagcaaaagcagactacgagaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttca
 acaggggagagtg (SEQ ID NO: 78)

[164] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, содержащее не более чем 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотные замены относительно SEQ ID NO: 5, 10 и 13.

[165] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента содержит: три LCDR, где

LCDR1 содержит RASQGIX₁X₂YLA (SEQ ID NO: 79),

LCDR2 содержит AASTLQS (SEQ ID NO: 7) и/или

LCDR3 содержит QQLX₃SYPX₄T (SEQ ID NO: 80);

где X₁ выбран из S или N;

X₂ выбран из S или N;

X₃ представляет собой заряженную аминокислоту, выбранную из N или K; и/или

X₄ представляет собой гидрофобную аминокислоту, выбранную из F или W.

[166] Как будет понятно специалистам в данной области техники, любую такую последовательность CDR легкой цепи можно легко комбинировать, например, с помощью методик молекулярной биологии, с любыми другими последовательностями или доменами антител, приведенными в данном документе или известными в данной области техники, включая любые каркасные области, CDR или константные домены, или их части, описанные в данном документе или иным образом известные в данной области техники, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте любого формата, описанного в данном документе или известного в данной области техники.

[167] В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело против ВСМА содержит легкую цепь, которая содержит любую последовательность константного домена легкой цепи, например, константную последовательность легкой цепи, известную специалистам в данной области техники. Как известно специалистам в данной области техники, константный домен легкой цепи может представлять собой константный домен легкой цепи каппа или константный домен легкой цепи лямбда. В определенных вариантах осуществления константный домен легкой цепи, описанный в данном документе, представляет собой константный домен легкой цепи каппа. В различных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело против ВСМА содержит константный домен легкой цепи.

Типовые антитела

[168] Сконструированные антитела могут содержать различные тяжелые цепи и легкие цепи, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит две тяжелые цепи и легкие цепи. В различных вариантах осуществления настоящее изобретение включает антитело, содержащее по меньшей мере одну тяжелую цепь и/или легкую цепь, описанную в данном документе, по меньшей мере один каркасный домен тяжелой цепи и/или легкой цепи, описанный в данном документе, по меньшей мере один домен CDR тяжелой цепи и/или легкой цепи, описанный в данном документе, и/или любой константный домен тяжелой цепи и/или легкой цепи, описанный в данном документе.

[169] В некоторых вариантах осуществления сконструированные антитела содержат аминокислотную последовательность VH иммуноглобулина, идентичную SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность VL иммуноглобулина, идентичную SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат область VL иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 13; и область VH иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит аминокислотную последовательность VH и/или VL, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 и/или SEQ ID NO: 13, и в то же время содержит одну или более из последовательностей vHCDR1, vHCDR2, vHCDR3, vLCDR1, vLCDR2 и/или vLCDR3, описанных в данном документе.

[170] В некоторых вариантах осуществления антитела к ВСМА или их фрагменты, описанные в данном документе, содержат общую переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит последовательности vHCDR и vLCDR:

vHCDR1: SYAIH (SEQ ID NO: 2)

vHCDR2: VTWHDGSNKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3)

vHCDR3: AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4)

vLCDR1: RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11)

vLCDR2: AASTLQS (SEQ ID NO: 7)

vLCDR3: QQLNSYPWT (SEQ ID NO: 14)

[171] В определенных вариантах осуществления CDR идентифицированы в соответствии с системой нумерации Kabat.

[172] В некоторых вариантах осуществления сконструированные антитела содержат аминокислотную последовательность VH иммуноглобулина, идентичную SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность VL иммуноглобулина, идентичную SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат область VL иммуноглобулина, содержащую

аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 5; и область VH иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит аминокислотную последовательность VH и/или VL, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 и/или SEQ ID NO: 1, и в то же время содержит одну или более из последовательностей vHCDR1, vHCDR2, vHCDR3, vLCDR1, vLCDR2 и/или vLCDR3, описанных в данном документе.

[173] В некоторых вариантах осуществления антитела к ВСМА или их фрагменты, описанные в данном документе, содержат общую вариабельную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит последовательности vHCDR и vLCDR:

vHCDR1: SYAIH (SEQ ID NO: 2)

vHCDR2: VTWHDGSNKYAESVMG (SEQ ID NO: 3)

vHCDR3: AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4)

vLCDR1: RASQGINNYLA (SEQ ID NO: 6)

vLCDR2: AASTLQS (SEQ ID NO: 7)

vLCDR3: QQLKSYPT (SEQ ID NO: 8)

[174] В определенных вариантах осуществления CDR идентифицированы в соответствии с системой нумерации Kabat.

[175] В некоторых вариантах осуществления сконструированные антитела содержат аминокислотную последовательность VH иммуноглобулина, идентичную SEQ ID NO: 9, и аминокислотную последовательность VL иммуноглобулина, идентичную SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат область VL иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 10; и область VH иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит аминокислотную последовательность VH и/или VL, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9 и/или SEQ ID NO: 10, и в то же время содержит одну или более из последовательностей vHCDR1, vHCDR2, vHCDR3, vLCDR1, vLCDR2 и/или vLCDR3, описанных в данном документе.

[176] В некоторых вариантах осуществления антитела к ВСМА или их фрагменты, описанные в данном документе, содержат общую вариабельную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА содержит последовательности vHCDR и vLCDR:

vHCDR1: SYAIH (SEQ ID NO: 2)

vHCDR2: VTWHDGSNKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3)

vHCDR3: AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4)

vLCDR1: RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11)

vLCDR2: AASTLQS (SEQ ID NO: 7)

vLCDR3: QQLNSYPFT (SEQ ID NO: 12)

[177] В определенных вариантах осуществления CDR идентифицированы в соответствии с системой нумерации Kabat.

Типовые одноцепочечные переменные фрагменты

[178] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен одноцепочечный переменный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой scFv человека. «Одноцепочечный переменный фрагмент» или «scFv» относится к слитому белку из переменных областей тяжелой (V_H) и легкой цепей (V_L) иммуноглобулина (например, мышинового или человеческого), ковалентно связанных с образованием гетеродимера $V_H::V_L$. Тяжелая (V_H) и легкая цепи (V_L) соединены напрямую или соединены пептид-кодирующим линкером (например, из 10, 15, 20, 25 аминокислот), который соединяет N-конец V_H с C-концом V_L или C-конец V_H с N-концом V_L . Обычно линкер является богатым глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости. Линкер может связывать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. Неограничивающие примеры линкеров описаны в Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008) и WO 2014/087010, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой линкер G4S.

[179] В дополнительном или альтернативном варианте scFv может быть получен из Fab (а не из антитела, например, быть получен из библиотек Fab). В определенных вариантах осуществления антитело против ВСМА или его фрагмент представляют собой Fab. В определенных вариантах осуществления Fab является перекрестно-связанным. В определенных вариантах осуществления антитело против ВСМА или его фрагмент представляют собой $F(ab)_2$. Любая из вышеперечисленных молекул может содержаться в слитом белке с гетерологичной последовательностью с образованием антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента.

[180] В определенных вариантах осуществления антитело против ВСМА или его фрагмент связывается с ВСМА (например, ВСМА человека) с константой диссоциации (K_d) по меньшей мере около 1×10^{-12} М, по меньшей мере около 1×10^{-7} М, по меньшей мере около 1×10^{-8} М, по меньшей мере около 1×10^{-9} М или по меньшей мере около 1×10^{-10} М. В определенных вариантах осуществления антитело против ВСМА или его фрагмент связывается с ВСМА (например, ВСМА человека) с константой диссоциации (K_D) по меньшей мере около 2×10^{-8} М. В определенных вариантах осуществления антитело против ВСМА или его фрагмент связывается с ВСМА (например, ВСМА человека) с константой диссоциации (K_D) от около 2×10^{-8} М до около 8×10^{-9} М.

[181] В определенных вариантах осуществления антитело против ВСМА или его фрагмент связывается с ВСМА (например, ВСМА человека) с константой диссоциации (K_D) от около 1 нМ до 50 нМ, от около 5 нМ до 30 нМ, от около 5 нМ до 25 нМ или от около 8 нМ до 20 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА или его фрагмент связывается с ВСМА (например, ВСМА человека) с константой диссоциации (K_D) по меньшей мере около 50 нМ, по меньшей мере около 40 нМ, по меньшей мере около 35 нМ, по меньшей мере около 30 нМ, по меньшей мере около 25 нМ, по меньшей мере около 20 нМ, по меньшей мере около 19 нМ, по меньшей мере около 18 нМ, по меньшей мере около 17 нМ, по меньшей мере около 16 нМ, по меньшей мере около 15 нМ, по меньшей мере около 14 нМ, по меньшей мере около 13 нМ, по меньшей мере около 12 нМ, по меньшей мере около 11 нМ, по меньшей мере около 10 нМ, по меньшей мере около 9 нМ, по меньшей мере около 8 нМ, по меньшей мере около 7 нМ, по меньшей мере около 6 нМ, по меньшей мере около 5 нМ.

[182] В некоторых вариантах осуществления анти-ВСМА scFv содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1-4. В некоторых вариантах осуществления анти-ВСМА scFv содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую одну или более последовательностей CDR, приведенных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления анти-ВСМА scFv содержит переменную область легкой цепи, содержащую одну или более последовательностей легкой цепи, приведенных в таблице 2.

[183] В некоторых вариантах осуществления анти-ВСМА scFv содержит линкер, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 15, которая представлена ниже:

GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления анти-ВСМА scFv содержит линкер, содержащий или состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 81, которая представлена ниже:

ggagggggcggtagcggagggggaggatctgggggtggggctcc (SEQ ID NO: 81)

[184] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, приведенной ниже:

GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 16)

[185] В некоторых вариантах осуществления анти-ВСМА scFv содержит линкер, содержащий или состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 82, которая представлена ниже:

gggggggggggagcggaggggggggagtgggtgggggtcaggagggggaggaagt (SEQ ID NO: 82)

[186] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, приведенной ниже:

GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 17)

[187] В некоторых вариантах осуществления анти-ВСМА scFv содержит линкер, содержащий или состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 83, которая представлена ниже:

gggggaggggatcaggagggcgggtgggagcgggggaggtggatccgggtggagggtcaggaggtggagggtcc (SEQ ID NO: 83).

[188] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, приведенной ниже:

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 18)

[189] В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA scFv содержит линкер, содержащий или состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 84, которая представлена ниже:

ggtggtggcggcagcggcggcggcggtagcgggtggcggcggttctggaggaggagcagcgggtggaggaagcggaggtggagggtcc (SEQ ID NO: 84).

[190] В некоторых вариантах осуществления антитело против BCMA или его фрагмент содержит консервативную модификацию последовательности (например, антитело против BCMA или его фрагмент, описанные в данном документе). В некоторых вариантах осуществления консервативная модификация последовательности представляет собой аминокислотную модификацию, которая не оказывает существенного влияния или не изменяет характеристики связывания описанного в данном документе антитела к BCMA или его фрагмента (например, антитела или его фрагмента), содержащего эту аминокислотную последовательность. Консервативные модификации могут включать аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации можно вносить в антитела к BCMA или их фрагменты с помощью стандартных методик, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Аминокислоты можно разделить на группы в соответствии с их физико-химическими свойствами, такими как заряд и полярность. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяется аминокислотой из той же группы. Например, аминокислоты можно классифицировать по заряду: положительно заряженные аминокислоты включают лизин, аргинин, гистидин, отрицательно заряженные аминокислоты включают аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, а нейтрально заряженные аминокислоты включают аланин, аспарагин, цистеин, глутамин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин. Кроме того, аминокислоты можно классифицировать по полярности: полярные аминокислоты включают аргинин (основные полярные), аспарагин, аспарагиновую кислоту (кислотные полярные), глутаминовую кислоту (кислотные полярные), глутамин, гистидин (основные полярные), лизин (основные полярные), серин, треонин и тирозин; неполярные аминокислоты включают аланин, цистеин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан и валин. Таким образом, один или более аминокислотных остатков в области CDR можно заменять другими аминокислотными остатками из той же группы и исследовать измененное антитело в отношении сохранения функции. В определенных вариантах осуществления изменяют не более одного, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти остатков в пределах указанной последовательности или области CDR.

[191] В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA scFv содержит аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVAVTWHGDSN
KYYAESVMGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTGVYYCARAKFGEPQYFQHWGQGT
TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQ
KPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPFTFG
PGTKVDIK (SEQ ID NO: 85)

[192] В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA scFv содержит аминокислотную последовательность:

QITLRESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVAVTWHG
GSNKYYAESVMGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTGVYYCARAKFGEPQYFQHWG
QGTTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGINNYLAW
YQQKPGIAPKLLIYAASTLQSGVPSRFGGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLKSYPF
TFGPGTKVEIK (SEQ ID NO: 86)

[193] В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA scFv содержит аминокислотную последовательность:

QITLRESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVAVTWHG
GSNKYYAESVMGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTGVYYCARAKFGEPQYFQHWG
QGTTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAW
YQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYP
WTFGQGTKVDIK (SEQ ID NO: 87)

[194] В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA scFv содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 51-53. В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA scFv содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 51-53, и в то же время содержит соответствующие вариабельные области. В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA scFv содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 51-53, и в то же время содержит соответствующие области CDR.

Нуклеотидные последовательности

[195] Настоящее изобретение включает нуклеотидные последовательности, кодирующие одну или более тяжелых цепей, вариабельных доменов тяжелой цепи, каркасных областей тяжелой цепи, CDR тяжелой цепи, константных доменов тяжелой цепи, легких цепей, вариабельных доменов легкой цепи, каркасных областей легкой цепи, CDR легкой цепи, константных доменов легкой цепи или другие иммуноглобулин-подобные последовательности, или антитела, описанные в данном документе. В

некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности являются кодон-оптимизированными для экспрессии у млекопитающих. В различных вариантах осуществления такие нуклеотидные последовательности могут находиться в векторе. В различных вариантах осуществления такие нуклеотиды могут находиться в геноме клетки, например клетки субъекта, нуждающегося в лечении, или клетки для получения антитела, например клетки млекопитающего для получения антитела.

Сконструированные антитела и слитые белки

[196] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены слитые белки, содержащие (i) одну или более антигенсвязывающих областей, описанных в данном документе (например, антигенсвязывающую область иммуноглобулина, антитела на основе тяжелой цепи, антитела на основе легкой цепи, антитела на основе LRR или другого белкового остова с подобными антителу свойствами, а также другого антигенсвязывающего фрагмента, известного в данной области техники, включая, например, Fab, Fab', Fab'2, Fab₂, Fab₃, F(ab')₂, Fd, Fv, Feb, scFv, SMIP, антитело, диатело, триатело, тетратело, минитело, tandab, DVD, BiTe, TandAb и т. п.), например один или более переменных доменов, описанных в данном документе, или их частей (например, одну или более CDR, описанных в данном документе), и (ii) один или более дополнительных полипептидов. Например, альбумин представляет собой широко распространенный сывороточный белок, который защищен от деградации за счет pH-зависимого рециклинга, опосредованного взаимодействием с FcRn. В некоторых вариантах осуществления один или более переменных доменов или сконструированных антител, описанных в данном документе, или их частей (например, одна или более CDR, описанных в данном документе) слиты с альбумином, его частью (такой как часть альбумина, которая связывается с FcRn) и/или сконструированным вариантом альбумина, который связывается с FcRn с повышенной аффинностью. В других случаях один или более переменных доменов или сконструированных антител, описанных в данном документе, или их частей (например, одна или более CDR, описанных в данном документе) слиты с полипептидом, который связывается с альбумином с образованием комплекса слитый белок - альбумин, который в свою очередь может связываться с FcRn. В некоторых вариантах осуществления полипептид, который связывается с альбумином, представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). Альбумин или его часть может содержать мутацию одной или более аминокислот, которые могут модифицировать его связывание с FcRn. Такие мутации известны в данной области техники (смотрите, например, Andersen et al., *Nature Communications* 3:610 doi: 10.1038/ncomms1607 (2012)). В других случаях один или более переменных доменов или сконструированных антител, описанных в данном документе, или их частей (например, одна или более CDR, описанных в данном документе) слиты с трансферрином. Трансферрин подвергается рециклингу за счет связывания с рецептором трансферрина (смотрите, например, Widera et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:1439-66 (2003)).

Chimeric antigenic receptor (CAR)

[197] В некоторых примерах антитела к ВСМА также можно использовать в комбинации с антиген-специфическими агентами, такими как специфические в отношении опухолевых антигенов CAR (также известные как химерные антигенные рецепторы, искусственные Т-клеточные рецепторы или химерные иммунорецепторы), и/или цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL), сконструированными для экспрессии CAR. В общем случае CAR содержат связывающий фрагмент, внеклеточный шарнирный и спейсерный элемент, трансмембранную область и эндодомен, который выполняет сигнальные функции (Cartellieri et al., *Biomed Biotechnol* 2010:956304, 2010). Во многих случаях связывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент моноклонального антитела, такой как scFv, или представляет собой однодоменное антитело. Для создания CAR использовали несколько разных эндодоменов. Например, эндодомен может состоять из сигнальной цепи, имеющей ИТАМ, такой как CD3 ζ или FcRI γ . В некоторых случаях эндодомен дополнительно содержит внутриклеточную часть по меньшей мере одного дополнительного костимулирующего домена, такого как CD28 и/или CD137.

[198] Антитела к ВСМА и их фрагменты в соответствии с настоящим изобретением конструируют так, чтобы они содержали один или более фрагментов, которые специфически связывают одну или более представляющих интерес мишеней. Внеклеточная антигенсвязывающая область, такая как scFv, или Fab может быть частью CAR, которая определяет антигенную специфичность. Внеклеточная антигенсвязывающая область может связываться с любой комплементарной мишенью, такой как ВСМА. В определенных аспектах любого варианта осуществления, описанного в данном документе, внеклеточная антигенсвязывающая область, такая как scFv, может содержать CDR легкой цепи, специфическую в отношении антигена. CDR легкой цепи может представлять собой определяющую комплементарность область антигенсвязывающего звена, такого как легкая цепь scFv CAR. Антитела к ВСМА и их фрагменты включают нуклеиновые кислоты (например, РНК и ДНК), белки (например, антитела) и их комбинацию.

[199] CTL, экспрессирующие CAR, можно использовать для нацеливания на конкретный тип клеток, такой как опухолевые клетки. Таким образом, специфическое в отношении опухолевого антигена моноклональное антитело можно использовать для конструирования CTL, которые экспрессируют CAR, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антиген-специфического антитела, тем самым нацеливая сконструированные CTL на экспрессирующие опухолевый антиген опухолевые клетки. Сконструированные Т-клетки ранее использовали для адоптивной терапии для некоторых типов рака (смотрите, например, Park et al., *Mol Ther* 15(4):825-833, 2007). Применение Т-клеток, экспрессирующих CAR, является более универсальным, чем стандартная иммунотерапия на основе CTL, поскольку CTL, экспрессирующие CAR, не рестриктированы по HLA и, следовательно, их можно использовать для любого пациента, имеющего опухоль, которая экспрессирует целевой антиген.

Антитело или его фрагмент в качестве связывающих фрагментов

[200] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в данном документе, представляют собой антитело против ВСМА. В некоторых случаях один или более связывающих фрагментов, описанных в данном документе, представляют собой или включают антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и/или Fc-области (или Fc-фрагменты). Базовая структура антитела IgG состоит из двух идентичных легких полипептидных цепей и двух идентичных тяжелых полипептидных цепей, связанных вместе дисульфидными связями. Первый домен, расположенный на амино-конце каждой цепи, является варибельным по аминокислотной последовательности, обеспечивая специфичность связывания антитела, присущую каждому индивидуальному антителу. Они известны как варибельная область тяжелой цепи (VH) и варибельная область легкой цепи (VL). Другие домены каждой цепи являются относительно инвариантными по аминокислотной последовательности и известны как константная область тяжелой цепи (CH) и константная область легкой цепи (CL). В случае антитела IgG легкая цепь содержит одну варибельную область (VL) и одну константную область (CL). Тяжелая цепь IgG содержит варибельную область (VH), первую константную область (CH1), шарнирную область, вторую константную область (CH2) и третью константную область (CH3). В антителах IgE и IgM тяжелая цепь содержит дополнительную константную область (CH4).

[201] Антитела могут включать, например, моноклональные антитела, рекомбинантно полученные антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, сконструированные антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи, мономер на основе легкой цепи антитела, мономер на основе тяжелой цепи антитела, димер на основе легкой цепи антитела, димер на основе тяжелой цепи антитела, пару легкая цепь антитела - тяжелая цепь антитела, интратела, слияния антител (иногда называемые в данном документе «конъюгатами антител»), гетероконъюгированные антитела, однодоменные антитела, одновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), верблюжьи антитела, аффитела, фрагменты Fab, фрагменты F(ab')₂, дисульфид-связанные Fv (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-анти-Id антитела), минитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые «миметиками антител») и антигенсвязывающие фрагменты любого из перечисленного выше. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, относятся к популяциям поликлональных антител.

[202] В контексте данного документа термин «Fc-фрагмент» относится к одному или более фрагментам Fc-области, которые сохраняют функцию и/или активность Fc, описанную в данном документе, такую как связывание с Fc-рецептором. В контексте данного документа термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически

связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, включают фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fv, фрагмент scFv, фрагмент dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546) и выделенную определяющую комплементарную область (CDR). Эти фрагменты антител можно получать, используя традиционные методики, известные специалистам в данной области техники, и проводить скрининг фрагментов в отношении функциональности таким же образом, что и для интактных антител.

[203] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложены антитела или их фрагменты, которые связываются с ВСМА человека, содержащие константные области тяжелой и/или легкой цепей человека, где константная область тяжелой цепи человека содержит изотипический вариант, содержащий Fc-область IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека или IgG4 человека.

[204] В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложены гуманизованное антитело или его фрагмент, которые связываются с ВСМА человека, где антитело содержит вариантную Fc-область IgG человека, которая содержит аминокислотную замену S324N, замещающую серин в аминокислотной позиции 324 родительского антитела аспарагином, где антитело, содержащее вариантную Fc-область IgG человека, демонстрирует улучшенную комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ) по сравнению с родительским антителом.

[205] Антитела или фрагменты можно получать любым способом, известным в данной области техники для синтеза антител (смотрите, например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 182:41-50; WO 92/22324; WO 98/46645). Химерные антитела можно получать, используя способы, описанные, например, в Morrison, 1985, *Science* 229:1202, а гуманизованные антитела - способами, описанными, например, в патенте США № 6180370.

[206] Дополнительные композиции и способы, описанные в данном документе, относятся к биспецифическим антителам и мультивалентным антителам, описанным, например, в Segal et al., *J. Immunol. Methods* 248:1-6 (2001); and Tutt et al., *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Сконструированные антигенсвязывающие области

[207] В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент включает антитело (например, антитело IgG, например, антитело IgG1, IgG2 или IgG3) или его антигенсвязывающий фрагмент, сконструированные для связывания с одной или более мишенями (т. е. антигеном) с разной аффинностью. Например, антитело может быть сконструировано путем модификации (например, путем добавления, удаления или замены) аминокислоты в одной или более CDR антитела и/или в позиции, вовлеченной в структуру CDR антитела. Типовые неограничивающие сайты антитела, которые можно модифицировать, включают следующие (аминокислотные позиции указаны на основании нумерации Kabat (Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, NIH)).

[208] В некоторых вариантах осуществления одна или более из этих описанных аминокислот могут быть заменены гистидином, аргинином, лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, серином, треонином, аспарагином или глутамином. Не ограничиваясь теорией, считается, что замена аминокислоты в одной или более из этих позиций гистидином может привести к тому, что антитело будет иметь рН-зависимые антигенсвязывающие свойства. В некоторых вариантах осуществления отличный от гистидина остаток заменен остатком гистидина. В некоторых вариантах осуществления остаток гистидина заменен отличным от гистидина остатком. Дополнительные сконструированные антигенсвязывающие области включают описанные, например, в публикации США № 20110229489.

Сконструированные константные области

[209] В некоторых случаях связывающий фрагмент представляет собой или содержит константную область антитела, Fc-область или Fc-фрагмент, которые связываются с одним или более Fc-рецепторами (например, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIV или FcRn-рецептором).

[210] В некоторых случаях связывающий фрагмент может представлять собой или содержать константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, сконструированные так, чтобы содержать добавление, делецию или замену одного или более аминокислотных остатков, описанных в данном документе (например, 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436 (нумерация Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH))).

Создание и выработка антител к ВСМА и их фрагментов

[211] В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА, описанное в данном документе, создают путем иммунизации гуманизированной мыши ВСМА человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в данном документе, дополнительно конструируют так, чтобы они содержали один или более связывающих фрагментов. Например, можно получить последовательность эталонного полипептида (например, терапевтического антитела или терапевтического связывающего белка) и добавить, удалить или заменить один или более аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления один или более аминокислотных остатков заменены глицином, аланином, серином, цистеином, фенилаланином, триптофаном, тирозином, пролином, гистидином, метионином, лейцином, изолейцином, аргинином, валином, лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, треонином, аспарагином или глутамином. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен повышают связывание антитела с ВСМА.

[212] Антитела можно получать рекомбинантным способом путем выделения антител и клеток, вырабатывающих антитела, из организма животных-хозяев, получения генной последовательности и использования генной последовательности для рекомбинантной экспрессии антител в клетках-хозяевах (например, клетках CHO). Другой способ, который можно использовать, заключается в экспрессии последовательности

антитела в растениях (например, табаке) или трансгенном молоке. Способы рекомбинантной экспрессии антител в растениях или молоке были описаны. Смотрите, например, Peeters, et al. *Vaccine* 19:2756, 2001 ; Lonberg, N. and D. Huszar *Int. Rev. Immunol* 13:65, 1995; and Pollock, et al., *J Immunol Methods* 231:147, 1999. Способы получения производных антител, например, гуманизированных, одноцепочечных и т. д., известны в данной области техники.

Измерение взаимодействия связывающих фрагментов и мишеней

[213] Связывающие свойства антитела или его фрагмента, описанных в данном документе (например, антитела к ВСМА, описанного в данном документе) с мишенью (например, ВСМА и/или FcRn) можно измерять способами, известными в данной области техники, например, одним из следующих способов: анализ ВΙΑСОРЕ, ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), рентгеновская кристаллография, анализ последовательностей и сканирующий мутагенез. Взаимодействие связывания антитела и ВСМА и/или FcRn можно анализировать, используя поверхностный плазмонный резонанс (ППР). ППР или биомолекулярный анализ взаимодействия (БАИ) позволяет выявлять биоспецифические взаимодействия в режиме реального времени без мечения какого-либо из взаимодействующих компонентов. Изменения массы на поверхности связывания (которые указывают на событие связывания) чипа БАИ приводят к изменениям показателя преломления света вблизи поверхности. Изменения преломляемости генерируют выявляемый сигнал, который измеряют как показатель реакций между биологическими молекулами в режиме реального времени. Способы применения ППР описаны, например, в патенте США № 5641640; Raether (1988) *Surface Plasmons* Springer Verlag; Sjolander and Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345; Szabo et al. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705 и онлайн-ресурсах, предоставленных ВΙΑсоре International AB (Uppsala, Sweden). Кроме того, также можно использовать анализ KinExA® (Kinetic Exclusion Assay), доступный от Sapidyne Instruments (Boise, Id.).

[214] Информацию, полученную с помощью ППР, можно использовать для точного и количественного измерения равновесной константы диссоциации (K_D) и кинетических параметров, включая K_{on} и K_{off} , для связывания связывающей молекулы с мишенью (например, антитела к ВСМА с ВСМА и/или FcRn). Такие данные можно использовать для сравнения разных молекул. Информацию, полученную с помощью ППР, также можно использовать для получения зависимости активности от структуры (ЗАС). Например, можно оценивать кинетические и равновесные параметры связывания конкретных связывающих молекул с мишенями при различных уровнях pH. Можно определять варианты аминокислоты в определенных позициях, которые коррелируют с конкретными параметрами связывания, например, высокой аффинностью, низкой аффинностью и медленной K_{off} , при конкретных уровнях pH.

Варианты осуществления CAR

[215] Кроме того, настоящее изобретение относится к способам и композициям, в которых конструкции ВСМА CAR лучше подходят для применения в НК-клетках,

поскольку они имеют один или более компонентов, более релевантных для НК-клеток, в отличие от биологии, которая подходила для других иммунных клеток, включая Т-клетки.

[216] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к слитому белку химерного антигенного рецептора (CAR), содержащему от N-конца к С-концу: (i) одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) против ВСМА (т. е. «ВСМА-связывающая молекула»), (ii) шарнирную область; (iii) трансмембранный домен и (iv) один или более внутриклеточных сигнальных доменов, таких как по меньшей мере один костимулирующий домен и активирующий домен.

[217] В конкретных вариантах осуществления изобретение относится к перепрограммированию НК-клеток (например, НК-клеток, полученных из пуповинной крови (ПК)) для нацеливания на раковые клетки, экспрессирующие ВСМА. В изобретении предложен ряд новых CAR-конструкций, включающих разные ВСМА scFv, слитые с шарнирной областью, в частности, с шарнирной областью CD28 или IgG1, трансмембранным доменом и сигнальным доменом, содержащим цитоплазматические части CD247 (также известного как CD3ζ) и CD28. В альтернативных вариантах осуществления используют другие костимулирующие домены, помимо CD28.

ВСМА-связывающие фрагменты

[218] Подходящая ВСМА-связывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой scFv, который специфически связывается с ВСМА. как правило, scFv может иметь форму VH-линкер-VL или VL-линкер-VH.

[219] Можно использовать конкретный линкер, который связывает цепи VH и VL. Одним из примеров линкерной аминокислотной последовательности является следующая:

GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 15) или, GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 16) или GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 17) или GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 18) или GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCC (SEQ ID NO: 24). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 15-18 и 24.

[220] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 16).

[221] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающая область ВСМА-CAR содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающая молекула содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), т. е. HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), т. е. LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в областях VH и VL, соответственно.

[222] В некоторых вариантах осуществления HCDR1 содержит аминокислотную

последовательность SYAIH (SEQ ID NO: 2), HCDR2 содержит аминокислотную последовательность VTWHDGSNKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3) и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4).

[223] В некоторых вариантах осуществления LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASQGINNYLA (SEQ ID NO: 6), LCDR2 содержит аминокислотную последовательность AASTLQS (SEQ ID NO: 7) и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность QQLKSYPT (SEQ ID NO: 8).

[224] В некоторых вариантах осуществления LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11), LCDR2 содержит аминокислотную последовательность AASTLQS (SEQ ID NO: 7) и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность QQLNSYPPT (SEQ ID NO: 12).

[225] В некоторых вариантах осуществления LCDR1 содержит аминокислотную последовательность RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11), LCDR2 содержит аминокислотную последовательность AASTLQS (SEQ ID NO: 7) и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность QQLNSYPWT (SEQ ID NO: 14).

[226] В некоторых вариантах осуществления вариabельная область тяжелой цепи (VH) BCMA-связывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность:

QITLRESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVAVTWHD
GSKYYAESVMGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAEDTGVYYCARAKFGEPQYFQHWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1).

[227] Подразумевается, что любую аминокислотную замену в любой позиции, кроме последовательностей CDR, можно заменить другой аминокислотой, например, консервативная аминокислотная замена (по определению в данном документе). В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 70% идентичной SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 75% идентичной SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 80% идентичной SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 85% идентичной SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 90% идентичной SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 95% идентичной SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 99% идентичной SEQ ID NO: 1.

[228] В некоторых вариантах осуществления вариabельная область тяжелой цепи (VH) BCMA-связывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVAVTWH
DGSNKYYAESVMGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAEDTGVYYCARAKFGEPQYFQHW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 9).

[229] Подразумевается, что любую аминокислотную замену в любой позиции,

кроме последовательностей CDR, можно заменить другой аминокислотой, например, консервативная аминокислотная замена (по определению в данном документе). В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 70% идентичной SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 75% идентичной SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 80% идентичной SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 85% идентичной SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 90% идентичной SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 95% идентичной SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления VH содержит последовательность, которая является на 99% идентичной SEQ ID NO: 9.

[230] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающая молекула содержит вариабельную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления VL содержит аминокислотную последовательность:

DIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGINNYLAWYQQKPGIAPKLLIYAASTLQS
GVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLKSYPTFGPGTKVEIK (SEQ ID NO:
5).

[231] Подразумевается, что любую аминокислотную замену в любой позиции, кроме последовательностей CDR, можно заменить другой аминокислотой, например, консервативная аминокислотная замена (по определению в данном документе). В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 70% идентичной SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 75% идентичной SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 80% идентичной SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 85% идентичной SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 90% идентичной SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 95% идентичной SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 99% идентичной SEQ ID NO: 5.

[232] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающая область CAR содержит вариабельную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления VL содержит аминокислотную последовательность:

DIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQS
GVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPPTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:
10).

[233] Подразумевается, что любую аминокислотную замену в любой позиции,

кроме последовательностей CDR, можно заменить другой аминокислотой, например, консервативная аминокислотная замена (по определению в данном документе). В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 70% идентичной SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 75% идентичной SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 80% идентичной SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 85% идентичной SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 90% идентичной SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 95% идентичной SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 99% идентичной SEQ ID NO: 10.

[234] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающая область CAR содержит вариабельную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления VL содержит аминокислотную последовательность:

DIVMTQSPSFLSASVGDRVITICRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPWTFGQGTKVDIK (SEQ ID NO: 13).

[235] Подразумевается, что любую аминокислотную замену в любой позиции, кроме последовательностей CDR, можно заменить другой аминокислотой, например, консервативная аминокислотная замена (по определению в данном документе). В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 70% идентичной SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 75% идентичной SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 80% идентичной SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 85% идентичной SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 90% идентичной SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 95% идентичной SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления VL содержит последовательность, которая является на 99% идентичной SEQ ID NO: 13.

[236] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающая молекула в химерном антигенном рецепторе содержит VH с SEQ ID NO: 1 и VL с SEQ ID NO: 5.

[237] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающая молекула в химерном антигенном рецепторе содержит VH, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 1, и VL, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 5.

[238] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающая молекула в химерном антигенном рецепторе содержит VH, по меньшей мере на 75% идентичную

химерном антигенном рецепторе содержит VH, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 1, и VL, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 13.

[253] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающая молекула в химерном антигенном рецепторе содержит VH, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1, и VL, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 13.

[254] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающая молекула в химерном антигенном рецепторе содержит VH, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, и VL, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 13.

[255] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающая молекула в химерном антигенном рецепторе содержит VH, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 1, и VL, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 13.

[256] В некоторых вариантах осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с константой диссоциации (K_d) около 1×10^{-7} М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула специфически связывает антиген с «высокой аффинностью», когда K_d составляет от около 1×10^{-9} М до около 5×10^{-9} М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула специфически связывает антиген с «очень высокой аффинностью», когда K_d составляет от 1×10^{-10} М до около 5×10^{-10} М. В одном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула имеет K_d 10^{-9} М. В одном варианте осуществления скорость диссоциации составляет менее 1×10^{-5} . В других вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывает ВСМА человека с K_d от около 1×10^{-7} М до около 1×10^{-13} М. В другом варианте осуществления антигенсвязывающая молекула связывает ВСМА человека с K_d от около 1×10^{-10} М до около 5×10^{-10} М.

[257] В другом конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, перекрестно не реагируют с другими белками в аналогичных условиях связывания. В другом конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, перекрестно не реагируют с другими отличными от ВСМА белками. В конкретном варианте осуществления в данном документе предложены антитело или его фрагмент, которые связываются с ВСМА с большей аффинностью, чем с другим, неродственным антигеном. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены антитело или его фрагмент, которые связываются с ВСМА (например, ВСМА человека) с аффинностью, большей на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более, чем с другим, неродственным антигеном, согласно данным измерения, например, методом радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или кинетического анализа исключения. В конкретном варианте осуществления степень связывания антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, с неродственными, отличными от ВСМА белками, составляет менее 10%, 15% или 20% от связывания антитела с белком ВСМА согласно данным измерения, например, методом радиоиммуноанализа.

[258] В конкретном варианте осуществления в данном документе предложены антитело или его фрагмент, которые связываются с ВСМА человека с большей аффинностью, чем с ВСМА других видов. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены антитело или его фрагмент, которые связываются с ВСМА человека с аффинностью, большей на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или более, чем с ВСМА других видов, согласно данным измерения, например, методом радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или кинетического анализа исключения. В конкретном варианте осуществления антитело или его фрагмент, описанные в данном документе, которые связываются с ВСМА человека, могут связываться с белком ВСМА другого вида с менее чем 10%, 15% или 20% от связывания антитела или его фрагмента с ВСМА человека, согласно данным измерения, например, методом радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или кинетического анализа исключения.

Шарнирная область

[259] В конкретных вариантах осуществления полипептид CAR содержит внеклеточный спейсерный домен (который также может называться шарниром), соединяющий антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен. Шарнирный домен представляет собой спейсер, который обеспечивает отделение scFv от клеточной мембраны и внутриклеточного сигнального модуля, что опосредует активацию NK-клеток или Т-клеток. Внеклеточные спейсерные домены могут содержать, но не ограничиваются этим, шарнирную область из белка человека. Например, в одном варианте осуществления шарнирная область может представлять собой шарнирную область Ig человека (иммуноглобулина), например, шарнирную область IgG4 или шарнирную область CD8a, искусственные спейсеры из полипептидов, таких как Gly3, или домены CH1, CH2 и/или CH3 IgG (таких как IgG1 или IgG4 человека).

[260] В конкретных случаях внеклеточный спейсерный домен может содержать (i) шарнирную область, области CH2 и CH3 IgG4, (ii) шарнирную область IgG4, (iii) шарнирную область и CH2 IgG4, (iv) шарнирную область CD8-альфа, (v) шарнирную область CD28, (vi) шарнирную область, области CH2 и CH3 IgG1, (vii) шарнирную область IgG1.

[261] В соответствии с настоящим изобретением, особенно применимую шарнирную область получают из CD28. В некоторых вариантах осуществления полипептид CAR содержит конкретную шарнирную аминокислотную последовательность CD28 или кодируется конкретной шарнирной последовательностью нуклеиновых кислот CD28. Ниже приведены примеры:

[262] Типовая подходящая шарнирная область CD28 содержит следующую аминокислотную последовательность:

RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPKDPK (SEQ ID NO: 36)

[263] Типовая подходящая шарнирная область CD28 кодируется следующей

последовательностью нуклеиновой кислоты:

cgggcgccgcaattgaagttatgtatcctcctctctctacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaaggga
aасacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagcccaaatcccaaa (SEQ ID NO: 35)

[264] Типовая подходящая шарнирная область IgG содержит следующую аминокислотную последовательность:

RTVTVSSQDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGKKDKP (SEQ ID NO: 37)

[265] Типовая подходящая шарнирная область IgG содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

cgtacggctactgtctcttcacaggatccccgccgagcccaaatctctgacaaaaactcacacatgcccaccgtgcccagacct
gaactcctggggggaccgtcagttctctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggg
tggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcaagacaaagccgcgg
gaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtcaa
ggtctccaacaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgc
ccccatccccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgctgcaaaaggtcttatcccagcgacatcgccgtggagtggg
agagcaatgggcaaccggagaacaactacaagaccagcctcccgctgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccg
tgacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctccgtgatgatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctct
ccctgtctccgggtaaaaaagatcccaaa (SEQ ID NO: 38)

Трансмембранный домен

[266] Трансмембранный домен соединяет внутриклеточный сигнальный домен с шарнирной областью CAR. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления подходящий трансмембранный домен в соответствии с настоящим изобретением представляет собой трансмембранный домен CD28, 4-1BB/CD137, CD8 (например, CD8 альфа), CD4, CD19, CD3 эпсилон, CD45, CD5, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CTLA4, PD-1 или CD154. Типовые трансмембранные домены описаны в WO2020227446, в полном объеме включенной в данный документ.

[267] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность:

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIFWV (SEQ ID NO: 26)

[268] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты:

ttttgggtgctgggtggtggtggagtcctggctgctatagcttgcctagtaaacagtgccctttattttctgggtg (SEQ
ID NO: 27)

Костимулирующий домен

[269] CAR может содержать один или более костимулирующих доменов. Костимулирующие сигналы необходимы для обеспечения эффективного химерного антигенного рецептора (CAR), включая размножение клеток, функцию, персистенность и противоопухолевую активность. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая область в соответствии с настоящим изобретением представляет собой сигнальную область CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белка запрограммированной гибели 1 (PD-1), индуцибельного костимулятора Т-клеток (ICOS), лимфоцитарный функциональный антиген 1 (LFA-1 (CD11a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член 14 суперсемейства факторов некроза опухолей; TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), Fc-гамма-рецептора, молекулы ГКГС класс I, белков рецепторов TNF, иммуноглобулин-подобных белков, рецепторов цитокинов, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, рецептора лиганда Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, который специфически связывается с CD83, или любую их комбинацию.

[270] В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен содержит:
RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (**SEQ ID NO: 28**)

[271] В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен кодируется:
aggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggccccaccgcaagcattacc
agccctatgccccaccagcgacttcgagcctatcgctca (**SEQ ID NO: 29**)

Активирующий домен

[272] В соответствии с изобретением конструкции CAR также может содержать домен активации. В конкретных вариантах осуществления полипептид CAR содержит фрагмент активации иммунных клеток. Фрагмент активации действует в сочетании с костимулирующим фрагментом для активации последующих сигнальных каскадов, которые приводят к активации NK-клеток, пролиферации, приобретению эффекторных функций и секреции воспалительных цитокинов и хемокинов. В некоторых вариантах осуществления фрагмент активации представляет собой CD3ζ.

[273] Одним из примеров аминокислотной последовательности CD3ζ является следующая:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA

LPPR (SEQ ID NO: 30)

[274] Одним из примеров последовательности нуклеиновой кислоты CD3 ζ является следующая:

cgcgtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctagga
cgaagagaggagtacgatgttttgacaaaagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaacctcagga
ggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcggcgaggggcaagggg
cacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc (SEQ ID
NO: 31)

Сигнальный пептид

[275] В конкретных вариантах осуществления полипептид CAR содержит сигнальный пептид. Сигнальный пептид является частью эктодомена полипептида CAR. В некоторых вариантах осуществления эктодомен является частью белка CAR, которая находится за пределами цитоплазмы и выходит во внеклеточное пространство. Функция сигнального пептида заключается в передаче распознанного белкового сигнала в клеточный эндоплазматический ретикулум. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид может быть выбран из сигнального пептида тяжелой цепи, сигнального пептида IL-15, сигнального пептида CD8a, сигнального пептида GMCSF-R.

[276] Одним из примеров аминокислотной последовательности сигнального пептида является следующая:

MEFGLSWLFLVAILKGVQC (SEQ ID NO: 51)

[277] Одним из примеров последовательности нуклеиновой кислоты сигнального пептида является следующая:

atggaattcggattgtcatggttctcctcgtcgaattctcaagggcgtgcagtgc (SEQ ID NO: 52).

[278] Одним из примеров аминокислотной последовательности сигнального пептида является следующая:

MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEA (SEQ ID NO: 32)

[279] Одним из примеров последовательности нуклеиновой кислоты сигнального пептида является следующая:

Atgcgcatagcaagccccacctgaggagcatcagcatccagtgtacctgtgcctgtgtgaaacagccacttctgaccga
ggcc (SEQ ID NO: 33).

[280] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит сайт расщепления. Одним из примеров сайта расщепления является:

GPQCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 39).

[281] В некоторых вариантах сайт расщепления кодируется:

ggaccgcagtgtactaattatgctctctttaaattggctggagatgttgagagcaatccccgggcc (SEQ ID NO: 40).

Цитокины

[282] В некоторых вариантах осуществления экспрессия цитокинов в экспрессирующих CAR клетках улучшает их противоопухолевую эффективность. В одном варианте осуществления цитокин экспрессируется как часть CAR. В другом варианте осуществления цитокин экспрессируется в отдельной экспрессионной системе. В

некоторых вариантах осуществления цитокин может быть выбран из IL-15, IL-12, IL-2, IL-18, IL-21 или их комбинации. В одном варианте осуществления цитокин выбран из гормонов роста, таких как гормон роста человека, N-метионилловый гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксина; инсулина; проинсулина; релаксина; прорелаксина; гликопротеиновых гормонов, таких как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); фактора роста печени (HGF); фактора роста фибробластов (FGF); пролактина; плацентарного лактогена; мюллеровой ингибирующей субстанции; пептида, связанного с гонадотропином мыши; ингибина; активина; фактора роста эндотелия сосудов; интегрина; тромбозина (TPO); факторов роста нервов (NGF), таких как NGF-бета; фактора роста тромбоцитов; трансформирующих факторов роста (TGF), таких как TGF-альфа и TGF-бета; инсулиноподобного фактора роста-I и -II; эритропоетина (EPO); остеиндуктивных факторов; интерферонов, таких как интерферон-альфа, бета и -гамма; колониестимулирующих факторов (CSF), таких как макрофагальный КСФ (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (GM-CSF); и гранулоцитарный КСФ (G-CSF); интерлейкинов (IL), таких как IL-1, IL-1 альфа, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-15, фактора некроза опухоли, такого как TNF α или TNF-бета; и других полипептидных факторов, включая LIF и комплектный лиганд (KL).

[283] В одном варианте осуществления цитокин представляет собой IL-15. В одном варианте осуществления область цитокина IL-15 содержит следующую аминокислотную последовательность:

GIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKV
TAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKE
FLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO: 23).

[284] Одним из примеров последовательности нуклеиновой кислоты IL-15 является следующая:

ggcatccacgtgtcatcctgggctgcttcagcgcggactgcccagaccgaggccaactgggtgaacgtgatcagcgacct
gaagaagatcgaggacctgatccagagcatgcacatcgacgccaccctgtacaccgagagcgacgtgcacccagctgcaaggtgacc
gccatgaagtgtttctgctggaactgcaggtgatcagcctggaaagcggcgacgccagcatccacgacaccgtggagaacctgatc
ctggccaacaacagcctgagcagcaacggcaacgtgaccgagagcggctgcaaagagtgcgaggaactggaagagaagaacatcaaa
gagtttctgcagagcttcgtgcacatcgtgcagatgttcatcaacaccagc (SEQ ID NO: 34)

[285] В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15, включенный в настоящее изобретение, может содержать SEQ ID NO: 23 или последовательность, которая является по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более % идентичной SEQ ID NO: 23.

Суицидальный ген

[286] В конкретных вариантах осуществления суицидальный ген используют в сочетании с клеточной терапией любого типа для контроля ее применения и прекращения клеточной терапии при необходимом событии и/или в необходимое время. Суицидальный ген используют в трансдуцированных клетках для того, чтобы вызвать гибель

трансдуцированных клеток, когда это необходимо. Нацеленные на антиген клетки по настоящему изобретению, которые были модифицированы для содержания вектора, включенного в изобретение, могут содержать один или более суицидальных генов. В некоторых вариантах осуществления термин «суицидальный ген» в контексте данного документа определяется как ген, который при введении пролекарства или другого агента приводит к превращению генного продукта в соединение, которое убивает клетку-хозяина. В других вариантах осуществления суицидальный ген кодирует генный продукт, который при необходимости становится мишенью для агента (такого как антитело), нацеленного на продукт суицидального гена. Термин «продукт суицидального гена» описывает белок или полипептид, кодируемый суицидальным геном.

[287] Примерами комбинаций суицидальный ген/лекарственный препарат, которые можно использовать, являются тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSV-tk) и ганцикловир, ацикловир или FIAU; оксидоредуктаза и циклогексимид; цитозиндезаминаза и 5-фторцитозин; тимидинкиназа - тимидилат киназа (Tdk::Tmk) и AZT; и дезоксицитидинкиназа и цитозинарабинозид. Можно использовать пуриновую нуклеозидфосфорилазу *E.coli*, так называемый суицидальный ген, который превращает пролекарство 6-метилпуриндезоксирибозид в токсичный пурин 6-метилпурин. Другими примерами суицидальных генов, применяемых в пролекарственной терапии, являются ген цитозиндезаминазы *E. coli* и ген тимидинкиназы HSV.

[288] Типовые суицидальные гены также включают CD20, CD52, EGFRv3 или индуцибельную каспазу 9. В одном варианте осуществления в качестве суицидального антигена, который может быть аблирован цетуксимабом, можно использовать усеченную версию варианта EGFR III (EGFRv3). Другие известные в данной области техники суицидальные гены, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают пуриновую нуклеозидфосфорилазу (PNP), ферменты цитохрома p450 (CYP), карбоксипептидазы (CP), карбоксилэстеразу (CE), нитроредуктазу (NTR), гуанин-рибозилтрансферазу (XGRTP), ферменты гликозидазы, метионин- α,γ -лиазу (MET) и тимидинфосфорилазу (TP).

[289] В некоторых вариантах осуществления в качестве типового суицидального гена используют индуцибельную каспазу 9 (iC9). Пример iC9 описан, например, в Yagyu S, et al. Mol Ther. 2015 Sep;23(9):1475-85, в полном объеме включенной в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления i-каспаза 9 содержит аминокислотную последовательность:

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVI
 GPQREEFPRLDLSISPLAQAVRSSSRTPSDKPVANHVANPQAEGQLQWLNRRANALLAN
 GVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSP
 CQRETPEGAEAKPWYEPYLLGGVVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIL
(SEQ ID NO: 25).

[290] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам и композициям, которые обеспечивают окончание клеточной терапии с

использованием нерасщепляемых мутантов 26 кДа TNF α . Мутанты TNF α являются нерасщепляемыми, что делает их мембраносвязанными и несекретируемыми. Клетки, экспрессирующие нерасщепляемые мутанты TNF α , можно нацеливать на селективное удаление, например, с помощью одобренных FDA антител к TNF α , которые в настоящее время используются в клинических условиях, таких как этанерцепт, инфликсимаб или адалилумаб. Мутированный полипептид TNF α может экспрессироваться совместно с одним или более терапевтическими трансгенами, такими как ген, кодирующий CAR. Кроме того, клетки, экспрессирующие мутант TNF- α , обладают превосходящей активностью против опухолевой мишени, опосредованной биологической активностью мембраносвязанного белка TNF α .

[291] В конкретных вариантах осуществления суицидальный ген представляет собой мутант фактора некроза опухоли (TNF) α , который не расщепляется стандартными ферментами, расщепляющими TNF в природе, такими как TNF α -конвертирующий фермент (также называемый TACE). Следовательно, мутант TNF α является мембраносвязанным и несекретируемым в конкретных вариантах осуществления. Мутант TNF α , используемый в изобретении, является мишенью для одного или более агентов, связывающих мутант, включая по меньшей мере антитело, так что после связывания агента(ов) с мутантом TNF α на поверхности клетки, клетка погибает. Варианты осуществления изобретения позволяют использовать мутант TNF α в качестве маркера для клеток, которые его экспрессируют.

[292] Клетки, экспрессирующие нерасщепляемые мутанты TNF α , можно нацеливать на селективное удаление, например, с помощью одобренных FDA антител к TNF α , которые в настоящее время используются в клинических условиях, таких как этанерцепт, инфликсимаб или адалилумаб. Мутированный полипептид TNF α может экспрессироваться совместно с одним или более терапевтическими трансгенами в клетке, такими как ген, кодирующий CAR, включая нацеленные на BCMA CAR. Кроме того, клетки, экспрессирующие мутант TNF-альфа, обладают превосходящей активностью против опухолевой мишени, опосредованной биологической активностью мембраносвязанного белка TNF α .

[293] TNF α дикого типа имеет 26 кДа трансмембранную форму и 17 кДа секреторный компонент. В некоторых вариантах осуществления мутанты TNF α , описанные в Perez et al. (1990), можно использовать в этом изобретении. В конкретных вариантах осуществления мутант TNF α содержит делецию соответствующей аминокислоты в позиции -3, -2, -1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или их комбинации. Конкретные комбинации включают делеции в позициях от -3 до и включая 13; от -3 до и включая 12; от -3 до и включая 11; от -3 до и включая 10; от -3 до и включая 9; от -3 до и включая 8; от -3 до и включая 7; от -3 до и включая 6; от -3 до и включая 5; от -3 до и включая 4; от -3 до и включая 3; от -3 до и включая 2; от -3 до и включая 1; от -3 до и включая -1; от -3 до и включая -2; от -2 до и включая 13; от -2 до и включая 12; от -2 до и включая 11; от -2 до и включая 10; от -2 до и включая 9; от -2 до и включая 8; от -2 до и

включая 7; от -2 до и включая 6; от -2 до и включая 5; от -2 до и включая 4; от -2 до и включая 3; от -2 до и включая 2; от -2 до и включая 1; от -2 до и включая -1; от -1 до и включая 13; от -1 до и включая 12; от -1 до и включая 11; от -1 до и включая 10; от -1 до и включая 9; от -1 до и включая 8; от -1 до и включая 7; от -1 до и включая 6; от -1 до и включая 5; от -1 до и включая 4; от -1 до и включая 3; от -1 до и включая 2; от -1 до и включая 1; от 1 до и включая 13; от 1 до и включая 12; от 1 до и включая 11; от 1 до и включая 10; от 1 до и включая 9; от 1 до и включая 8; от 1 до и включая 7; от 1 до и включая 6; от 1 до и включая 5; от 1 до и включая 4; от 1 до и включая 3; от 1 до и включая 2; и т. д. В конкретных вариантах осуществления примеры мутаций TNF-альфа по изобретению включают по меньшей мере следующие мутации относительно 17 кДа TNF: (1) делеция Val1 и делеция Pro12; (2) делеция Val13; (3) делеция Val1 и делеция Val13; (4) делеция от Val1 до и включая Pro12 и делеция Val13 (удаление 13 ак); (5) делеция от Ala -3 до и включая Val 13 (удаление 16 ак).

[294] Мутантов TNF α можно создавать любым подходящим способом, но в конкретных вариантах осуществления их создают с помощью сайт-направленного мутагенеза. В некоторых случаях мутанты TNF α могут иметь мутации, отличные от тех, которые делают белок нерасщепляемым. В конкретных случаях мутанты TNF α могут иметь 1, 2, 3 или более мутаций, отличных от делеций Val, Pro12 и/или Val13 или области между ними. Мутации, отличные от тех, которые делают мутантов несекретируемыми, могут представлять собой одно или более из аминокислотной замены, делеции, добавки, инверсии и т. д. В случаях, когда дополнительная мутация представляет собой аминокислотную замену, замена может быть или не быть, например, консервативной аминокислотой. В некоторых случаях 1, 2, 3, 4, 5 или более дополнительных аминокислот могут присутствовать на N-конце и/или C-конце белка. В некоторых случаях мутант TNF α имеет (1) одну или более мутаций, которые делают мутанта несекретируемым; (2) одну или более мутаций, которые предотвращают внешнюю/внутреннюю сигнализацию для мутанта; и/или (3) одну или более мутаций, которые препятствуют связыванию мутанта с рецептором 1 TNF и/или рецептором 2 TNF.

[295] В конкретных вариантах осуществления мутантный полипептид TNF α содержит делецию относительно SEQ ID NO: 25 следующего: аминокислотного остатка 1 и аминокислотного остатка 12; аминокислотного остатка 1 и аминокислотного остатка 13; аминокислотных остатков 1-12; аминокислотных остатков 1-13; или аминокислотных остатков от -1 до 13.

[296] Типовые последовательности мутантного полипептида TNF α , его мутанты и варианты описаны в WO2020106619 и WO2021055349, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Типовые полноразмерные последовательности BCMA-CAR

[297] В некоторых вариантах осуществления BCMA-CAR содержит аминокислотную последовательность, содержащую:
MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQA

PGKGLEWVAVTWHDGSNKYYAESVMGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAEDTGVYYCA
 RAKFGEPQYFQHWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSFLSASVGDRVT
 ITCRASQGISSYLAWYQQKPKGAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPE
 DFATYYCQQLNSYPFTFGPGTKVDIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTPIHVKGKHLCP
 PLFPGSPKPKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRR
 PGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
 KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQG
 LSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 19).

[298] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 19.

[299] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую:

atggaattggactgtcatggcttttctgtgccatcctgaaaggggtacagtgtgaagtgcaactggtcgaatctgggggaga
 cgtgtccagcccgggaggtcttgcggtgtcatgcgcagcttactttctctcaccatccattgggttcggcaagcgctg
 gtaagggactcgaatgggtgcatgacctggcatgacggatcaacaagtattatgcagaatcagtaatgggcaggttaccattcacgc
 gacaatagcaaaaatacactttatttgcacatgaattcactcagagccgaagataccggcgtctattattgcgccagagcaaaattggggag
 ccacagtactccaacattggggacaaggcactaccgtcaccgtgagttcaggcgggggggatcaggcggaggaggttcaggcggcg
 gcggcagtgacatagtgatgactcagagtccttctttttagcgcgaagtgtgggatagggtcactataacgtgtagagcatctcaaggca
 tttctcatatttggcctggtatcaacagaaacctggaaagggcccaaaagctcttatttacgtgcatcaaccctgcaatctggcgtccaagc
 cgattctctgggtctggaagcggcacagaatttaccctgactatatcatctccaacctgaagatttggcacctattattgtcagcaattgaatt
 cataccgttcacattcggccctggaactaaagtcgacatcaagcgggcccggcgaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatg
 agaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaacaccttctccaagtccccctatttcccggaccttctaagcccaaatcccaat
 tttgggtgctgggtggtggtggagtcctggcttctatagcttctagtaaacagtggtccttattttctgggtgaggagtaagaggagc
 aggtcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccggggccaccgcaagcattaccagcctatgccccaccacgcga
 ctfcgagcctatcgtcacgcgtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagc
 tcaatctaggacgaagagaggagtagatgtttggacaaaagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaa
 ccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaagggcagcggcggagg

ggcaaggggcacgatggcctttaccaggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctgctga (SEQ ID NO: 42).

[300] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 75% идентичную SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 42.

[301] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR связан с IL-15 посредством линкера и расщепляемого пептида, содержащего SEQ ID NO: 45:

MEFGLSWLFLVAAILKGVQCEVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIH
WVRQAPGKGLEWVAVTWHDGSNKYYAESVMGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAEDT
GVYYCARAKFGEPQYFQHWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSFLSAS
VGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQLNSYPFTFGPGTKVDIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKG
KHLCPSPFPGPSKPKDPKFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYM
NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSI
SIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT
LYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGC
KECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO: 45)

[302] ВСМА-CAR, связанный с IL-15, представленный SEQ ID NO: 45, иногда называется в этом описании ВСМА28-1. Другой ВСМА-CAR, связанный с IL-15, в котором шарнирная область CD28 замещена шарнирной областью IgG1, иногда называется в этом описании ВСМАIg1.

[303] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную SEQ ID NO: 45. В некоторых

вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 45.

[304] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит:

atggaattggactgtcatggcttttctgtgccatcctgaaaggggtacagtgtgaagtcaactggcgaatctgggggaga
 cgtgtccagcccgggaggtcttgcggtgtcatgcgcagcttcaggtttactttctctcatacgccatccattgggttcggcaagcgctg
 gtaagggactcgaatgggttcagtgacctggcatgacggatcaacaagtattatgcagaatcagtaatgggcaggttaccatttcacgc
 gacaatagcaaaaatacactttatttgcacatgaattcactcagagccgaagataccggcgtctattatgcgccagagcaaaattggggag
 ccacagtaactccaacattggggacaaggcactaccgtcaccgtgagttcaggcgggggggatcaggcggaggagggtcaggcggcg
 gcggcagtgacatagtgatgactcagagtccttctttttagcgcgaagtgtgggatagggtcactataacgtgtagagcatctcaaggca
 tttctcatatttggcctggatcaacagaaacctgaaagggcccaaaagctccttatttacgctgcatcaaccctgcaatctggcgtcccaagc
 cgattctctgggtctggaagcggcacagaatttaccctgactatatcatctccaacctgaagatttggcacctattatgtcagcaattgaatt
 catacccggtcacattcggccctggaactaaagtcgacatcaagcggcggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatg
 agaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaacaccttctccaagtccccctatttcccgaccttctaagcccaaatcccaat
 tttgggtgctggtggtggtggtgagtcctggctgctatagcttgtagtaacagtgcccttattttctgggtgaggagtaagaggagc
 aggtcctcgcacagtgactacatgaacatgactccccgccggggccaccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcga
 ctfcgagcctatcgtcacgcgtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagc
 tcaatctaggacgaagagaggagtagatgtttggacaaaagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaa
 ccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaagcgagcggcgagg
 ggcaaggggcacgatggccttaccagggtcctcagtagaccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcagccctgccccctcg
 cggaccgcaagtfactaattatgctctcttgaattggctggagatgttagagcaatccccgggccatgcgcattagcaagccccacctgc
 ggagcatcagcatccagtgctacctgtgctgctgtaacagccacttctgaccgagccggcatccactgttcatcctgggctgcttc
 agcggccggactgcccagaccgaggccaactgggtgaactgtatcagcgacctgaagaagatcgaggacctgatccagagcatgcaca
 tcgagccacctgtacaccgagagcgcagctgacccccagctgcaagtgaccgcatgaagtgtttctgctggaactgcaggtgatca
 gcctggaagcggcgacgccagcatccacgacacctgggagaacctgatcatcctggccaacaacagcctgagcagcaacggcaactg
 gaccgagagcggctgcaaaagagtgcgaggaactggaagagaagaacatcaagagtttctgcagagcttctgcatatctgcatggtg
 catcaacaccagctga (SEQ ID NO: 46).

[305] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 75% идентичную SEQ ID

NO: 46. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 46.

[306] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, содержащую:
MEFGLSWLFLVAAILKGVQCQITLRESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQA
PGKGLEWVAVTWHDGSNKYYAESVMGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAEDTGVYYCA
RAKFGEPQYFQHWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSFLSASVGDRVT
ITCRASQGINNYLAWYQQKPGIAPKLLIYAASTLQSGVPSRFGGSGSGTEFTLTISLQPE
DFATYYCQQLKSYPTFGPGTKVEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP
PLFPGPSKPKDPKFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRR
PGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 20)

[307] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 20.

[308] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую:

atggaattcgggctgtcctggctttcttggcgaattcttaagggcgtccaatgtcagataactctgcgcgagtcaggaggaga
cgtggtgcaaccgggcagatctcaggcttcatgtgccgccagtggttcacatfctcttgaatacattgggtcaggcaggctcct
ggcaaggcgttggaaatgggtagcgggtacctggcatgatggatctaaacaatactacgccgagtctgttatgggtcgaattcacaattctcga
gacaattcaaaaaacacactctacctgcatatgaactcacttagagcagaggacactgggtgtctattactgcgccagagcaaaattcggcga
gccacagtatttccagcactggggacaaggaaccctcgtaacagtatctagtgggggcggagggtctggaggaggggggagcggggg
aggcggctctgatattgttatgaccaatcaccatctttctgagcgtagtgctggcgacaggggttacaatcacatgccgagcaagccaagg
aatcaacaattatctcgcgatggtatcaaaaaaccaggtatcggccgaaaacttctatttacgcagcatcaaccctgaaaaggaggtctct
tctagatttgggtggcagcggctccgggactgaattcactcttactatttctcctcaaccgaaagatttccacatattactgccagcagctt
aagtcatacccttacttttggcccaggaactaaagtgaatcaaacggcggccgcaattgaagtattatctctctcttactctagaca
atgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaacaccttctcaagtccttctccggaccttctaaagccaagatccca
aatttgggtgctggtggtggtggtgggtggtgctgctgcttagtaaacagtggcctttattttctgggtgaggagtaagagga
gcaggtcctgcacagtactacatgaacatgactccccgccccccggccccaccgcaagcattaccagccctatgccccaccagc
gacttcgcagcctatcgtcacgcgtgaagtgcagcaggagcgcagacccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacga
gctcaatctaggacgaagagaggactgatgtttggacaaaagacgtggccgggacctgagatggggggaaagccgagaaggaag
aacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaagccgagcggcgga
ggggcaaggggacgatggcctttaccaggtctcagtagccaccaaggacacctagcagccttcacatgcagccctgccccct
cgctga (SEQ ID NO: 43)

[309] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 75% идентичную SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 43.

[310] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR связан с IL-15 посредством линкера и расщепляемого пептида, содержащего SEQ ID NO: 47:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQITLRESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHW
VRQAPGKGLEWVAVTWHDGSNKYYAESVMGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAEDTGV
YYCARAKFGEPQYFQHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSFLSASVG
DRVITCRASQGINNYLAWYQQKPGIAPKLLIYAASLTQSGVPSRFGGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCQLKSYPTFTGPGTKVEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKH

LCPSPLFPGPSKPKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT
 TPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
 DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHG
 LYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSISI
 QCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY
 TESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKE
 CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO: 47)

[311] BCMA-CAR, связанный с IL-15, представленный SEQ ID NO: 47, иногда называется в этом описании BCMA28-2. Другой BCMA-CAR, связанный с IL-15, в котором шарнирная область CD28 замещена шарнирной областью IgG1, иногда называется в этом описании BCMAIg2.

[312] В некоторых вариантах осуществления BCMA-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления BCMA-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления BCMA-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления BCMA-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления BCMA-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления BCMA-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления BCMA-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления BCMA-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 47.

[313] В некоторых вариантах осуществления BCMA-CAR-IL15 содержит:

atggaattcgggctgtcctggtttcttggtcgaattcttaagggcgccaatgtcagataactctgcgcgagtcaggaggaga
 cgtggtgcaaccgggagatctctcaggcttcatgtgccagtggttcacattagctcttatgcaatacattgggtcaggcaggctcct
 ggcaagggcttggaaatgggtagcggttacctggcatgatgatctaaacaatactacgccgagctctgttatgggtcgattcacaatttctga
 gacaattcaaaaaacactctacctgcatatgaactcacttagagcagaggacactgggtgtctattactgcccagagcaaaattcggcga
 gccacagtattccagcactgggacaaggaaccctcgtaacagtatctagtgggggcggagggtctggaggaggggggagcggggg
 agcggctctgatattgttatgaccaatcaccatctttctgagcgtagtgtcggcgacagggttacaatcacatgccgagcaagccaagg
 aatcaacaattatctcgcgatggtatcaaaaaaccaggtatgcccccgaactcttattttacgcagcatcaacctgcaaagcggagttcct
 tctagatttggtggcagcggctccgggactgaattcactcttactatttctcctcaaccgaagatttccacatattactgccagcagctt
 aagtcatacccttacttttggcccaggaactaaagtgaatcaaacggcggccgcaattgaagtatgtatctctcttacttagaca
 atgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaacacctttgccaagtcccctatttcccggaccttctaagcccaagatcca
 aatttgggtgctggtggtggtggtgagtcctggttctatagcttctagtaacagtggtcttatttttctgggtgaggagtaagagga
 gcaggctcctgcacagtactacatgaacatgactccccgcccccggggcccaccgcaagcattaccagccctatccccaccacgc

gacttcgcagcctatcgctcacgcgtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacga
gctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaaaagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaag
aacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaagccgagcgcggga
ggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccct
cgcggaccgcagtgtactaattatgctctcttgaattggctggagatgttgagagcaatcccgggcccatgcgcattgcaagccccacct
gctggagcatcagcatccagtgtctctgtgctgctgaacagccacttctgaccgagggccgcatccacgtgttcatctgggctgct
tcagcggcggactgcccaagaccgagggccaactgggtgaactgatcagcagacctgaagaagatcaggacctgatccagagcatgca
catcgacgccaccctgtacaccgagagcgcagctgcaccccagctgcaaggtgaccgcatgaagtgtttctgctggaactgcagtgat
cagcctggaaagcggcgacgccagcatccagcagaccctgggagaacctgatcatctggccaacaacagcctgagcagcaacggcaa
cgtgaccgagagcggctgcaagagtgcgaggaactggaagagaagaacatcaagagtttctgcagagcttcgtgcacatcgtgcaga
tgttcatcaacaccagctga (SEQ ID NO: 48)

[314] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 75% идентичную SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 48.

[315] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, содержащую:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQITLRESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHW
VRQAPGKGLEWVAVTWHDGSNKYYAESVMGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAEDTGV
YYCARAKFGEPQYFQHWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIVMTQSPSFLSASVG
DRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCQQLNSYPWTFGQGTKVDIKRTVTVSSQDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYIT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLVVGGVLACYSL
LVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK

DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 21)

[316] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 21.

[317] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую:

```
atggaattcggattgtcatggtgttctctcgtcgaattctcaagggcgtgcagtgccaaactcttcgagagtccggcggagat
gtgttacagccaggagaagcctgagactctctgtgcagcaagcggattacctttcttctacgctatccactgggttagacaggtccc
ggtaagggactggaatgggtcgcagtaacatggcacgacggttcaataagtactacgcagagtcagtcattgggaaggttactatctcacg
ggacaattctaagaacacactctactctcatatgaactcctcagagctgaagacaccggcgtatattattgtgctagagctaaattggagaa
ccacagtatctcaactggggccaaggcacactgtgaacggttcaagcgggtgggggggtctggcggaggaggtagtgagggtgga
ggctccgatactgttatgacacaatcaccagcttctgtcagctctgttggtgatcgggtaacaactactgtcgcgcatctcagggtatcag
tcatactggcatggtatcagcaaaagcctggaaaagcccctaaactctgatttacgccgcgagcacactgcaaaaggagttccgtcaag
attctctggctctgggtccgggtaccgaattactttgactatcagctcactccaacctgaggatttcgccacgtactattccaacagcttaactc
ctatcctggacattggtcagggcactaaagttgatattaacgtacggctactgtctctcacaggatcccggcggagcccaaatctctgac
aaaactcacacatgcccaccgtgcccagcactgaactctggggggaccgtcagctctctctcccccaaaacccaaggacacctca
tgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcg
tggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctaccgtcctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaagcccctccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagg
gcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtggtcaaaag
gcttctatcccagcgacatcggcgtggagtgggagagcaatgggcaaccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactcc
gacggctccttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagg
ctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaaaaagatcccaattttgggtgctggtggtggtggtggagtc
ctggctgctatagcttgctagtaacagtggcctttattttctgggtgaggagtaagaggagcaggtcctgcacagtgactacatgaacat
gactccccggcggccggccaccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcacttcgcagcctatcgtcacgcgtgaagtt
cagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacga
gttttggacaaaagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactg
```

cagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaagcggagcggcggagggggcaaggggcacgatggcctttaccag
ggctctcagtagaccaccaaggacacctacgagcgccttcacatgcaggccctgccccctcgtga (SEQ ID NO: 44)

[318] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 75% идентичную SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 44.

[319] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR связан с IL-15 посредством линкера и расщепляемого пептида, содержащего SEQ ID NO: 49:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQITLRESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHW
VRQAPGKGLEWVAVTWHDGSNKYYAESVMGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAEDTGV
YYCARAKFGEPQYFQHWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSFLSASVG
DRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS
LQPEDFATYYCQQLNSYPWTFGQGTKVDIKRTVTVSSQDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLVVGGLVACYSL
LVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPRGPQCTNYAL
LKLADVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLNHFLTEAGIHVFILGCFSAAGLPKTEAN
WVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIH
TVENLILANNSLSSNGNVTEGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID
NO: 49)

[320] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную SEQ ID NO: 49. В некоторых

вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 49.

[321] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит:

```
atggaattcggattgtcatgggtgtcctcgtcgaattctcaagggcgtgcagtgccaaattactcttcgagagtccggcggagat
gtggtacagccaggagaagcctgagactctctgtgcagcaagcggattacctttctcttacgctatccactgggttagacaggtccc
ggtaagggactggaatgggtcgcagtaacatggcacgacggttcaataagtactacgcagagtcagtcatgggaaggttactatttcacg
ggacaattctaagaacacactctactctcatatgaactcctcagagctgaagacaccggcgtatattattgtgctagagctaaattggagaa
ccacagtatttcaacactggggccaaggcacactgttaacggttcaagcgggtgggggggtctggcggaggaggtagtggaggtgga
ggctccgatactgttatgacacaatcaccagcttctgtcagctctgttggatcgggtaacaattactgtcgcgcatctcagggtatcagt
tcatactggcatggtatcagcaaaagcctggaaaagcccctaaactctgatttacgccgcgagcacactgcaaaaggagtccgtcaag
attctctggctctgggtccgggtaccgaatttactttgactatcagctcactccaacctgaggatttcgccactactattccaacagcttaactc
ctatcctggacatttggtcagggcactaaagttgatattaacgtacggctactgtctcttcacaggatcccgccgagcccaaatctctgac
aaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactctggggggaccgtcagctctctcttcccccaaaacccaaggacacctca
tgatctcccggaccctgaggtcacatgctgtggtgggtgacgtgagccagaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcg
tggaggtgcataatgcaagacaaagccgcgggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctaccgtctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagg
gcagccccgagaaccacaggtgtacacctccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtgcaaaag
gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcaaccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactcc
gacggctccttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctcatgctccgtgatgcatgagg
ctctgcacaaccactacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaaaaagatcccaatttgggtgctggtggtggtggtggagtc
ctggctgctatagcttgctagtaacagtgcccttatttttctgggtgaggagtaagaggagcaggtcctgcacagtgactacatgaacat
gactccccgccggggggccaccgcaagcattaccagccctatccccaccacgcgacttcgagcctatcgtcacgcgtgaagtt
cagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacga
tgtttggacaaaagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactg
cagaaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaagcgcagcgggggggcaaggggcacgatggcctttaccag
ggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccctcacatgcagccctgccccctcgcggaccgcagtgactaattatgctctctt
gaaattggctggagatgtgagagcaatccggggccatgcgcaatgcaagccccacctgcggagcatcagcatccagtgtacctgtg
cctgctgctgaacagccacttctgaccgagggccatccacgtgttcatctgggtgcttcagcggcggactgcccagaccgagggc
caactgggtgaactgatcagcgacctgaagaagatcgaggacctgatccagagcatgcacatcgacgccacctgtacaccgagagcg
acgtgacccccagctgcaaggtgaccgcatgaagtcttctgctggaactgcaggtgatcagcctggaaagcggcgacgccagcatcc
```

acgacaccgtggagaacctgatcatcctggccaacaacagcctgagcagcaacggcaacgtgaccgagagcggctgcaaagagtgcg
 aggaactggaagagaagaacatcaaagagtttctgcaagagcttcgtgcacatcgtgcagatgttcatcaacaccagctga (SEQ ID
 NO: 50)

[322] В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 75% идентичную SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 97% идентичную SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления ВСМА-CAR-IL15 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 50.

[323] Варианты осуществления изобретения включают клетки, которые экспрессируют один или более CAR и один или более суицидальных генов, включенных в данный документ. В конкретных вариантах осуществления НК-клетка содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более CAR и один или более сконструированных несекретируемых мембраносвязанных мутантных полипептидов TNF-альфа. В конкретных вариантах осуществления помимо экспрессии одного или более CAR и мутантных полипептидов TNF-альфа, клетка также содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более терапевтических генных продуктов.

Векторы

[324] В определенных аспектах в данном документе предложены векторы, содержащие полинуклеотид по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из ДНК вектора, РНК вектора, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, AAV-вектора или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой вирусный вектор. Примеры вирусных векторов включают по меньшей мере ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные или аденоассоциированные вирусные векторы. Примеры невирусных векторов включают по меньшей мере плазмиды, транспозоны, липиды, наночастицы и т. д.

[325] В случаях, когда иммунную клетку трансдуцируют вектором, кодирующим генетически сконструированный рецептор, и также необходима трансдукция в клетку

другого гена или генов, таких как суицидальный ген, и/или цитокин, и/или необязательный терапевтический генный продукт, нацеленный на антиген рецептор, суицидальный ген, цитокин и необязательный терапевтический ген могут быть или не быть включены в один и тот же вектор. В некоторых случаях CAR, суицидальный ген, цитокин и необязательный терапевтический ген экспрессируются из одной векторной молекулы, такой как одна вирусная векторная молекула. В таких случаях экспрессию CAR, суицидального гена, цитокина и необязательного терапевтического гена могут регулировать или нет одни и те же регуляторные элементы. Когда CAR, суицидальный ген, цитокин и необязательный терапевтический ген находятся в одном векторе, они могут экспрессироваться в виде отдельных полипептидов или нет. В случаях, когда они экспрессируются в виде отдельных полипептидов, они могут быть разделены в векторе, например, элементом 2A или элементов IRES (или же оба типа могут использоваться в одном векторе один или более раз).

[326] В некоторых вариантах осуществления цитокины и суицидальные гены экспрессируются из одного полипептида, где они разделены элементом 2A. В некоторых вариантах осуществления элемент 2A может индуцировать прорыв рибосомы во время трансляции белка в клетке.

[327] В некоторых вариантах осуществления элемент 2A содержит аминокислотную последовательность: QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 53).

Клетки

[328] Настоящее изобретение включает иммунные клетки или стволовые клетки любого типа, которые содержат по меньшей мере один вектор, который кодирует генетически сконструированный рецептор, содержащий BCMA CAR, содержащий шарнирный домен CD28. В некоторых случаях разные векторы кодируют CAR, суицидальный ген и/или цитокин. Иммунные клетки, включая NK-клетки, можно получать из пуповинной крови (включая объединенную пуповинную кровь из нескольких источников), периферической крови, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), гемопоэтических стволовых клеток (HSC), костного мозга или их смеси. NK-клетки можно получать из клеточной линии, такой как, например, но не ограничиваясь этим, клетки NK-92. NK-клетка представлять собой мононуклеарную клетку пуповинной крови, такую как CD56⁺ NK-клетка.

[329] Настоящее изобретение включает иммунные или другие клетки любого типа, включая традиционные Т-клетки, гамма-дельта Т-клетки, NKT- и инвариантные NK-Т-клетки, регуляторные Т-клетки, макрофаги, В-клетки, дендритные клетки, мезенхимальные стромальные клетки (МСК) или их смесь.

[330] NK-клетки являются критически важным компонентом врожденного иммунного ответа и важными участниками первой линии защиты от злокачественных клеток. Способность NK-клеток уничтожать злокачественные клетки без предварительной сенсibilизации способствует их быстрому действию в отличие от Т-клеток, которым требуется распознавание опухолевых антигенов, презентруемых в контексте HLA-

молекул.

[331] В некоторых случаях НК-клетки размножали в присутствии эффективного количества универсальных антигенпрезентирующих клеток (УАПК), в том числе в любом подходящем соотношении. Клетки можно культивировать с УАПК в соотношении от 10:1 до 1:10; от 9:1 до 1:9; от 8:1 до 1:8; от 7:1 до 1:7; от 6:1 до 1:6; от 5:1 до 1:5; от 4:1 до 1:4; от 3:1 до 1:3; от 2:1 до 1:2; или 1:1, в том числе в соотношении, например 1:2. В некоторых случаях НК-клетки размножали в присутствии IL-2, например, в концентрации 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200, 200-500, 200-400, 200-300, 300-500, 300-400 или 400-500 Е/мл.

[332] После генетической модификации вектором(ами) НК-клетки можно сразу инфузировать или можно хранить. В определенных аспектах после генетической модификации клетки можно размножать в течение дней, недель или месяцев *ex vivo* в виде общей популяции в пределах около 1, 2, 3, 4, 5 дней или более после переноса генов в клетки. В дополнительном аспекте трансфектанты клонируют, а клон, демонстрирующий наличие одной интегрированной или эпизомально поддерживаемой экспрессионной кассеты или плазмиды и экспрессию CAR, размножают *ex vivo*.

[333] Варианты осуществления изобретения включают клетки, которые экспрессируют один или более CAR и один или более суицидальных генов, включенных в данный документ. В конкретных вариантах осуществления НК-клетка содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более CAR и один или более сконструированных несекретируемых мембраносвязанных мутантных полипептидов TNF-альфа. В конкретных вариантах осуществления помимо экспрессии одного или более CAR и мутантных полипептидов TNF-альфа, клетка также содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более терапевтических генных продуктов.

[334] Клетки можно получать непосредственно от индивида или можно получать из депозитария или другого хранилища. Клетки в качестве терапии могут быть аутологичными или аллогенными по отношению к индивиду, которому клетки вводят в качестве терапии.

[335] Клетки можно получать от индивида, нуждающегося в терапии медицинского состояния, а после их обработки для экспрессии CAR, необязательного суицидального гена, необязательного(ых) цитокина(ов) и необязательного(ых) терапевтического(их) генного(ых) продукта(ов) (например, с использованием стандартных методов трансдукции и размножения для адоптивной клеточной терапии) их можно снова вводить индивиду, от которого они были изначально получены. В некоторых случаях клетки хранят для последующего применения для этого или другого индивида.

[336] Иммунные клетки могут состоять из популяции клеток, причем в этой популяции большинство клеток могут быть трансдуцированы одним или более рецепторами, и/или одним или более суицидальными генами, и/или одним или более цитокинами. Популяция клеток может содержать 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61,

62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% иммунных клеток, трансдуцированных одним или более CAR, и/или одним или более суицидальными генами, и/или одним или более цитокинами. Один или более CAR, и/или один или более суицидальных генов, и/или один или более цитокинов могут представлять собой отдельные полипептиды.

[337] Иммунные клетки можно получать с одним или более CAR, и/или одним или более суицидальными генами, и/или одним или более цитокинами для обеспечения модульности в отношении конкретной цели. Например, можно создавать клетки, в том числе для коммерческого распространения, экспрессирующие CAR, и/или один или более суицидальных генов, и/или один или более цитокинов (или распространять с нуклеиновой кислотой, которая кодирует мутант для последующей трансдукции), а пользователь может модифицировать их для экспрессии одного или более других представляющих интерес генов (включая терапевтические гены) в зависимости от предполагаемой(ых) цели(ей). Например, индивид, заинтересованный в обработке антиген-положительных клеток, включая антиген-положительные раковые клетки или инфицированные инфекционным агентом клетки, может получать или создавать экспрессирующие суицидальный ген клетки (или экспрессирующие гетерологичный цитокин клетки) и модифицировать их для экспрессии рецептора, содержащего антиген-специфический scFv, или наоборот.

[338] В конкретных вариантах осуществления используют НК-клетки, а геном трансдуцированных НК-клеток, экспрессирующих один или более CAR, и/или один или более суицидальных генов, и/или один или более цитокинов, можно модифицировать. Геном можно модифицировать любым образом, но в конкретных вариантах осуществления геном модифицируют, например, посредством редактирования генома на основе CRISPR. Геном клеток можно модифицировать, чтобы повысить эффективность клеток с любой целью.

[339] В качестве неограничивающих примеров НК-клетки могут экспрессировать ВСМА-связывающий CAR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-21, 45, 47 и 49. В некоторых примерах НК-клетки могут содержать полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42-44, 46, 48 и 50.

Способы лечения

[340] В различных вариантах осуществления пораженные заболеванием или другие клетки, экспрессирующие на своей поверхности необходимую мишень, являются мишенью в целях улучшения медицинского состояния индивида, который имеет это медицинское состояние, или снижения риска или отсрочки тяжести и/или начала медицинского состояния у индивида. В конкретных случаях раковые клетки, экспрессирующие эндогенный антиген, являются мишенью в целях уничтожения раковых клеток. В других случаях клетки, инфицированные инфекционным агентом, являются мишенью в целях уничтожения инфицированных клеток.

[341] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент,

описанные в данном документе (например, антитело против ВСМА, описанное в данном документе), применяют в способе лечения одного или более связанных с ВСМА состояний. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в данном документе (например, антитело против ВСМА, описанное в данном документе), предназначены для применения в качестве лекарственного средства. Связанные с ВСМА состояния могут включать, без ограничения, состояния, которые вызваны, включают, имеют симптомы, возникшие в целом или частично в результате, или возникшие в связи с экспрессией ВСМА.

[342] В соответствии с настоящим изобретением антитела, их фрагменты, CAR и композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения связанных с ВСМА видов рака. Рак относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводят к образованию злокачественных опухолей, которые проникают в соседние ткани и также могут метастазировать в отдаленные участки организма по лимфатической системе или кровотоку. В некоторых вариантах осуществления «рак» или «раковая ткань» включают солидную опухоль. Примеры видов рака, которые можно лечить способами по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются этим, рак иммунной системы, включая лимфому, лейкоз, миелому и другие злокачественные лейкоцитарные заболевания.

[343] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение агента, который связывает ВСМА (например, описанного в данном документе антитела к ВСМА или его фрагмента).

[344] В различных вариантах осуществления введение описанного в данном документе антитела или его фрагмента (например, описанного в данном документе антитела к ВСМА или его фрагмента) приводит к снижению распространенности, частоты, уровня и/или количества одного или более симптомов или биомаркеров связанного с ВСМА состояния, описанного в данном документе или иным образом известного в данной области техники, например, снижению по меньшей мере на 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% одного или более симптомов или биомаркеров по сравнению с предшествующим измерением у субъекта или с эталонным значением.

[345] В некоторых вариантах осуществления введение описанного в данном документе антитела или его фрагмента (например, описанного в данном документе антитела к ВСМА или его фрагмента) субъекту, имеющему рак, приводит к большему снижению или улучшению одного или более симптомов или биомаркеров рака, чем в случае эталонного антитела, например, антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание ВСМА, в сопоставимых условиях.

[346] В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело или его фрагмент (например, описанное в данном документе антитело против ВСМА) можно вводить в меньшей дозе по сравнению с эталонным белком, например,

антителом, которое перекрестно конкурирует за связывание ВСМА, где достигая эквивалентного, одинаково эффективного, сопоставимо эффективного или по существу эффективного результата, причем антитело против ВСМА вводят в идентичном, эквивалентном или по существу эквивалентном составе и/или идентичным, эквивалентным или по существу эквивалентным путем введения, что и эталон (например, антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание ВСМА). В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело против ВСМА можно вводить через большие интервалы по сравнению с эталонным антителом (например, антителом, которое перекрестно конкурирует за связывание ВСМА), где достигая эквивалентного, одинаково эффективного, сопоставимо эффективного или по существу эффективного результата, причем антитело против ВСМА вводят в идентичном, эквивалентном или по существу эквивалентном составе и/или идентичным, эквивалентным или по существу эквивалентным путем введения, что и эталон. В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело против ВСМА можно вводить в меньшем количестве единичных лекарственных форм и/или в течение меньшего периода лечения по сравнению с эталонным антителом, где достигая эквивалентного, одинаково эффективного, сопоставимо эффективного или по существу эффективного результата, причем антитело против ВСМА вводят в идентичном, эквивалентном или по существу эквивалентном составе и/или идентичным, эквивалентным или по существу эквивалентным путем введения, что и эталон (например, антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание ВСМА).

[347] В соответствии с такими вариантами осуществления вводимая доза описанного в данном документе антитела к ВСМА с меньшей вероятностью будет вызывать нежелательный ответ при введении субъекту, например нежелательный иммунный ответ, чем эффективная доза эталонного антитела, например, антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание ВСМА. Соответственно, в различных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело против ВСМА может с меньшей вероятностью чем эталонное антитело, в расчете на единицу вводимого активного вещества, индуцировать нежелательную реакцию или побочный эффект. В различных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело против ВСМА может с меньшей вероятностью чем эталонное антитело, в расчете на единицу вводимого активного вещества, индуцировать нежелательную реакцию или побочный эффект, имеющие определенную степень тяжести. В различных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело против ВСМА может индуцировать одну или более нежелательных реакций или один или более побочных эффектов в меньшей степени или у меньшего числа пациентов, чем эталонное антитело, в расчете на единицу вводимого активного вещества. Примеры нежелательных реакций или побочных эффектов, которые могут быть связаны с введением антитела, способного связывать ВСМА, могут включать головную боль, назофарингит, боль в спине, тошноту, диарею, гипертонию, инфекцию верхних дыхательных путей, боль в животе, рвоту, анемию,

кашель, периферические отеки и/или инфекцию мочевыводящих путей.

[348] В некоторых вариантах осуществления после введения субъекту (например, в однократной дозе) описанные в данном документе антитело или фрагмент (например, описанное в данном документе антитело против ВСМА) измеряются на повышенном уровне в плазме через определенное время после введения (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более дней) по сравнению с уровнем контроля в то же самое определенное время (например, антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание ВСМА). Например, через определенное время после введения однократной дозы уровень описанного в данном документе антитела к ВСМА является по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% или 500% большим, чем соответствующий уровень эталонного антитела.

[349] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе антитело или фрагмент (например, описанное в данном документе антитело против ВСМА) измеряются на повышенном уровне в плазме через определенное время (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более дней) после введения (например, в однократной дозе) по сравнению с уровнем контроля в то же самое определенное время. Например, через определенное время после введения уровень описанного в данном документе антитела к ВСМА является по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% или 500% большим, чем соответствующий уровень эталонного антитела.

[350] В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело против ВСМА имеет большее время полужизни (например, относительно контроля, например, эталонного антитела, например, антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание ВСМА) и, следовательно, антитело против ВСМА можно вводить субъекту с большими интервалами между дозами. Например, антитело против ВСМА можно вводить раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели раз в четыре недели, раз в 6 недель, раз в 8 недель или через большее время.

[351] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество описанных в данном документе антитела к ВСМА или его фрагмента составляет около 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5% от эффективного количества эталонного терапевтического белка, например, антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание ВСМА. В некоторых вариантах осуществления однократная доза описанного в данном документе антитела к ВСМА обеспечивает сопоставимый терапевтический эффект с двумя или более дозами эталонного антитела.

[352] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе антитело против ВСМА или его фрагмент вводят в дозе, которая составляет около 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5% концентрации целевого антигена (например, ВСМА) у субъекта.

[353] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе антитело против ВСМА или его фрагмент можно физически вводить субъекту, используя

любые из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Примеры путей введения составов, описанных в данном документе, включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, спинномозговой или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. В контексте данного документа выражение «парентеральное введение» означает режимы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию, а также *in vivo* электропорацию. В некоторых вариантах осуществления состав вводят не парентеральным путем, включающая местный, эпидермальный или мукозальный пути введения, например, интраназально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также можно осуществлять, например, один раз, много раз и/или в течение одного или более продолжительных периодов.

[354] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе антитело против ВСМА или его фрагмент можно использовать в ряде диагностических и терапевтических применений. например, выявляемо меченные версии сконструированных антител, описанных в данном документе, можно использовать в анализах для выявления наличия или количества ВСМА в образце (например, биологическом образце). Сконструированные антитела, описанные в данном документе, можно использовать в *in vitro* анализах для исследования связывания с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело против ВСМА можно использовать в качестве положительного контроля в анализе, разработанном для идентификации новых соединений, которые являются иным образом применимыми для лечения связанного с ВСМА нарушения. Например, описанное в данном документе антитело против ВСМА можно использовать в качестве положительного контроля в анализе для идентификации дополнительных соединений (например, малых молекул, аптамеров или антител), которые связываются с ВСМА.

[355] Описанные в данном документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно использовать при наблюдении субъекта, имеющего, предположительно имеющего, подверженного риску развития или проходящего лечение одного или более связанных с ВСМА состояний. Наблюдение может включать определение количества или активности ВСМА в организме субъекта, например, в сыворотке субъекта. В некоторых вариантах осуществления оценку проводят через по меньшей мере один (1) час, например, по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 24 или 48 часов, или по меньшей мере 1 день, 2 дня, 4 дня, 10 дней, 13 дней, 20 дней или более, или по меньшей мере 1 неделю, 2 недели, 4 недели, 10 недель, 13 недель, 20 недель или более после введения описанного в данном документе антитела к ВСМА. Оценка субъекта можно проводить в один или более из следующих

периодов: до начала лечения; во время лечения; или после применения одного или более элементов лечения. Оценка может включать оценку необходимости дальнейшего лечения, например, оценку того, следует ли изменять дозировку, частоту введения или продолжительность лечения. Она также может включать оценку необходимости добавления или отмены выбранного терапевтического метода, например, добавления или отмены любого из методов лечения связанного с ВСМА нарушения, описанного в данном документе. В одном варианте осуществления настоящего изобретения описан химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий ВСМА-связывающий домен, для лечения различных гемобластозов, включая множественную миелому. Белок ВСМА экспрессируется на раковой клетке. Связывающая антиген ВСМА часть CAR взаимодействует с эпитопом во внеклеточном домене фрагмента ВСМА.

[356] В конкретных вариантах осуществления конструкции CAR, последовательности нуклеиновых кислот, векторы, иммунные клетки и т. д., предусмотренные в данном документе, и/или содержащие их фармацевтические композиции используют для предотвращения, лечения или облегчения заболевания, такого как раковое заболевание. В конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть в особенности полезна для предотвращения, облегчения и/или лечения рака, включая виды рака, которые экспрессируют конкретный антиген и которые могут или нет представлять собой, например, солидных опухоли.

[357] Иммунные клетки, в отношении которых используют рецептор, могут представлять собой НК-клетки, Т-клетки, гамма-дельта Т-клетки, альфа-бета Т-клетки или NKT, или инвариантные NKT (iNKT), или инвариантные NKT-клетки, сконструированные для клеточной терапии млекопитающих, в конкретных вариантах осуществления. В тех случаях, когда клетки представляют собой НК-клетки, терапия НК-клетками может относиться к любому типу и НК-клетки могут относиться к любому типу. В конкретных вариантах осуществления клетки представляют собой НК-клетки, которые были сконструированы для экспрессии одного или более CAR, и/или одного или более суицидальных генов, и/или одного или более цитокинов. В конкретных вариантах осуществления клетки представляют собой НК-клетки, которые трансдуцированы CAR.

[358] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены, частично, CAR-экспрессирующие клетки, конструкции CAR, молекулы нуклеиновых кислот CAR и векторы CAR, которые можно вводить отдельно или в любой комбинации, используя стандартные векторы и/или системы доставки генов, и, по меньшей мере в некоторых аспектах, вместе с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. В определенных вариантах осуществления после введения молекулы нуклеиновых кислот или векторы могут стабильно интегрироваться в геном субъекта.

[359] В конкретных вариантах осуществления можно использовать вирусные векторы, которые являются специфическими в отношении определенных клеток или тканей и сохраняются в НК-клетках. Подходящие фармацевтически носители и

эксципиенты хорошо известны в данной области техники. Композиции, полученные в соответствии с изобретением, можно использовать для предотвращения, или лечения, или задержки идентифицированных выше заболеваний.

[360] Кроме того, изобретение относится к способу предотвращения, лечения или облегчения опухолевого заболевания, включающему этап введения нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества клеток, которые экспрессируют CAR, последовательности нуклеиновой кислоты, вектора, предусмотренных в данном документе, и/или полученных способом, предусмотренным в данном документе.

[361] Возможными показаниями для введения композиции(й) типовых CAR-клеток являются раковые заболевания, включая опухолевые заболевания, включая, например, В-клеточные злокачественные опухоли, множественную миелому, рак молочной железы, глиобластому, рак почки, рак поджелудочной железы или рак легкого. Типовыми показаниями для введения композиции(й) нацеленных на антиген CAR-клеток являются раковые заболевания, включая любые злокачественные заболевания, которые экспрессируют антиген. Введение композиции(й) по изобретению применимо для всех стадий (I, II, III или IV) и типов рака, включая, например, минимальное остаточное заболевание, раннюю стадию рака, распространенный рак и/или метастатический и/или рефрактерный рак.

[362] Изобретение дополнительно включает протоколы совместного введения с другими соединениями, например, конструкциями биспецифических антител, нацеленными токсинами или другими соединениями, которые действуют посредством иммунных клеток. Клиническая схема совместного введения соединения(й) по изобретению может включать совместное введение одновременно, до или после введения другого компонента. Конкретные виды комбинированной терапии включают химиотерапию, облучение, хирургическое вмешательство, гормональную терапию или другие виды иммунотерапии.

[363] В конкретном аспекте в изобретении предложен способ ингибирования пролиферации или уменьшения популяции ВСМА-экспрессирующих раковых клеток, включающий приведение популяции ВСМА-экспрессирующих раковых клеток в контакт с экспрессирующими анти-ВСМА CAR клетками по изобретению (например, экспрессирующими ВСМА CAR НК-клетками), которые связываются с ВСМА-экспрессирующими клетками. В одном аспекте в изобретении предложены способы ингибирования пролиферации или уменьшения популяции ВСМА-экспрессирующих раковых клеток, включающие приведение популяции ВСМА-экспрессирующих раковых клеток в контакт с экспрессирующей анти-ВСМА CAR клеткой по изобретению (например, экспрессирующей ВСМА CAR НК-клеткой), которая связывается с ВСМА-экспрессирующей клеткой. В определенных аспектах экспрессирующая анти-ВСМА CAR клетка (например, экспрессирующая ВСМА CAR НК-клетка) по изобретению уменьшает число, количество или процент клеток и/или раковых клеток у субъекта или в животной модели миелоидного лейкоза или другого рака, связанного с ВСМА-экспрессирующей

клеткой, на по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% относительно отрицательного контроля. В одном аспекте субъект представляет собой человека.

[364] В некоторых вариантах осуществления виды рака, для которых применимы представленные способы лечения, включают любой тип злокачественных клеток, таких как те, которые встречаются в солидных опухолях или гематологических опухолях. Типовые солидные опухоли могут включать, но не ограничиваются этим, опухоль органа, выбранного из группы, состоящей из поджелудочной железы, толстой и прямой кишки, желудка, мозга, головы, шеи, яичника, почки, гортани, саркомы, легкого, мочевого пузыря, меланомы, предстательной железы и молочной железы. Типовые гематологические опухоли включают опухоли костного мозга, Т- или В-клеточные злокачественные образования, лейкозы, лимфомы, бластомы, миеломы и т. п. Дополнительные примеры видов рака, которые можно лечить, используя способы, предложенные в данном документе, включают, но не ограничиваются этим, рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и сквамозную карциному легкого), рак брюшины, рак желудка (включая рак желудочно-кишечного тракта и стромальный рак желудочно-кишечного тракта), рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, различные типы рака головы и шеи, а также меланому.

[365] В частности, рак может относиться к следующему гистологическому типу, хотя и не ограничивается этим: новообразование, злокачественное; карцинома; карцинома недифференцированная; гигантская и веретенноклеточная карцинома; мелкоклеточная карцинома; папиллярная карцинома; плоскоклеточная карцинома; лимфоэпителиальная карцинома; базально-клеточная карцинома; пиломатриксная карцинома; переходноклеточная карцинома; папиллярная переходноклеточная карцинома; аденокарцинома; гастринома злокачественная; холангиокарцинома; гепатоцеллюлярная карцинома; комбинированная гепатоцеллюлярная карцинома и холангиокарцинома; трабекулярная аденокарцинома; аденоидно-кистозная карцинома; аденокарцинома в аденоматозном полипе; аденокарцинома, семейный полипоз толстой кишки; солидная карцинома; карциноидная опухоль, злокачественная; бронхиоло-альвеолярная аденокарцинома; папиллярная аденокарцинома; хромофобная карцинома; ацидофильная карцинома; оксифильная аденокарцинома; базофильная карцинома; светлоклеточная аденокарцинома; зернистоклеточная карцинома; фолликулярная аденокарцинома; папиллярная и фолликулярная аденокарцинома; неинкапсулирующая склерозирующая карцинома; карцинома коры надпочечников; эндометроидная карцинома; карцинома придатков кожи; апокрिनная аденокарцинома; сальная аденокарцинома; церуминозная аденокарцинома; мукоэпидермоидная карцинома; цистаденокарцинома; папиллярная цистаденокарцинома;

папиллярная серозная цистаденокарцинома; муцинозная цистаденокарцинома; муцинозная аденокарцинома; перстневидно-клеточная карцинома; инфильтрирующая карцинома протоков; медуллярная карцинома; дольковая карцинома; воспалительная карцинома; болезнь Педжета, молочной железы; ацинарно-клеточная карцинома; аденосквамозная карцинома; аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией; тимома злокачественная; опухоль стромы яичника злокачественная; текома злокачественная; гранулезоклеточная опухоль, злокачественная; андробластома злокачественная; карцинома клеток Сертоли; опухоль из клеток Лейдига злокачественная; опухоль из липидных клеток злокачественная; параганглиома злокачественная; экстрамаммарная параганглиома злокачественная; феохромоцитома; гломангиосаркома; злокачественная меланома; амеланотическая меланома; злокачественная меланома лентиго; акральные лентигинозные меланомы; нодулярные меланомы; поверхностно распространяющаяся меланома; злокачественная меланома в гигантском пигментном невусе; эпителиоидноклеточная меланома; голубой невус злокачественный; саркома; фибросаркома; фиброзная гистиоцитома злокачественная; миксосаркома; липосаркома; лейомиосаркома; рабдомиосаркома; эмбриональная рабдомиосаркома; альвеолярная рабдомиосаркома; стромальная саркома; смешанная опухоль злокачественная; мюллерова смешанная опухоль; нефробластома; гепатобластома; карциносаркома; мезенхимома злокачественная; опухоль Бреннера злокачественная; опухоль филлоидная злокачественная; синовиальная саркома; мезотелиома злокачественная; дисгерминома; эмбриональная карцинома; тератома злокачественная; струма яичников злокачественная; хориокарцинома; мезонефрома злокачественная; гемангиосаркома; гемангиоэндотелиома злокачественная; саркома Капоши; гемангиоперицитома злокачественная; лимфангиосаркома; остеосаркома; юстакортикальная остеосаркома; хондросаркома; хондробластома злокачественная; мезенхимальная хондросаркома; гигантоклеточная опухоль кости; Саркома Юинга; одонтогенная опухоль злокачественная; амелобластная одонтосаркома; амелобластома злокачественная; амелобластная фибросаркома; пинеалома злокачественная; хордома; глиома злокачественная; эпендимома; астроцитомы; протоплазматическая астроцитомы; фибриллярная астроцитомы; астробластома; глиобластома; олигодендроглиома; олигодендробластома; примитивная нейроэктодермальная опухоль; саркома мозжечка; ганглионейробластома; нейробластома; ретинобластома; нейрогенная опухоль обонятельного центра; менингиома злокачественная; нейрофибросаркома; неврилеммома злокачественная; зернистоклеточная опухоль злокачественная; злокачественная лимфома; болезнь Ходжкина; парагранулема Ходжкина; малая лимфоцитарная злокачественная лимфома; крупноклеточная, диффузная злокачественная лимфома; злокачественная фолликулярная лимфома; грибовидный микоз; другие уточненные неходжкинские лимфомы; В-клеточная лимфома; высокодифференцированная/фолликулярная неходжкинская лимфома (НХЛ); малая лимфоцитарная (МЛ) НХЛ; среднедифференцированная/фолликулярная НХЛ; среднедифференцированная диффузная НХЛ; среднедифференцированная

иммунобластная НХЛ; низкодифференцированная лимфобластная НХЛ; низкодифференцированная мелкоклеточная НХЛ с нерассеченными ядрами; массивная НХЛ; мантийноклеточная лимфома; СПИД-ассоциированная лимфома; макроглобулинемия Вальденстрема; злокачественный гистиоцитоз; множественная миелома; тучноклеточная саркома; иммунопролиферативное заболевание тонкой кишки; лейкоз; лимфолейкоз; лейкоз плазматических клеток; эритролейкоз; лимфосаркомоклеточный лейкоз; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; тучноклеточный лейкоз; мегакариобластный лейкоз; миелоидная саркома; волосатоклеточный лейкоз; хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); острый миелоидный лейкоз (ОМЛ); и хронический миелобластный лейкоз.

[366] В качестве неограничивающих примеров представлены антитела к ВСМА, CAR, клетки и композиции используют для лечения связанного с В-клетками заболевания. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой связанное с В-клетками заболевание. В некоторых вариантах осуществления связанное с В-клетками заболевание выбрано из группы, состоящей из плазмоцитомы, лимфомы Ходжкина, фолликулярной лимфомы, мелкоклеточной лимфомы с нерасщепленными ядрами, эндемической лимфомы Беркитта, спорадической лимфомы Беркитта, лимфомы маргинальной зоны, экстранодальной лимфомы мукозальной ткани, узловой моноцитойдной В-клеточной лимфомы, лимфомы селезенки, мантийноклеточной лимфомы, крупноклеточной лимфомы, диффузной смешанно-клеточной лимфомы, иммунобластной лимфомы, первичной средостенной В-клеточной лимфомы, В-клеточной легочной ангиоцентрической лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, В-клеточного или неизвестного злокачественного образования, лимфоматоидного гранулематоза, посттрансплантационного лимфопрлиферативного нарушения, иммунорегуляторного заболевания, ревматоидного артрита, миастении гравис, идиопатической тромбоцитопеной пурпуры, антифосфолипидного синдрома, болезни Шагаса, болезни Грейвса, гранулематоза Вегенера, узелкового полиартериита, синдрома Шегрена, пузырчатки обыкновенной, склеродермии, рассеянного склероза, антифосфолипидного синдрома, ANCA-ассоциированного васкулита, болезни Гудпасчера, болезни Кавасаки, аутоиммунной гемолитической анемии, быстро прогрессирующего гломерулонефрита, болезни тяжелых цепей и первичного или связанного с иммунными клетками амилоидоза.

Фармацевтические композиции

[367] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат эффективное количество композиций, содержащих НК-клетки, диспергированные в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, солюбилизатор, эмульгатор, консервант и/или адъювант. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит эксципиент. Приготовление фармацевтической композиции станет очевидным для специалистов в данной области техники в свете

настоящего описания и как проиллюстрировано в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2005, включенной в данный документ посредством ссылки. Кроме того, следует понимать, что для введения животным (например, человеку) препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты согласно требованиям департамента FDA по биологическим стандартам.

[368] В контексте данного документа «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты), изотонические агенты, агенты, замедляющие всасывание, соли, консерванты, лекарственные препараты, стабилизаторы лекарственных препаратов, гели, связующие вещества, эксципиенты, разрыхлители, смазывающие вещества, подсластители, вкусовые добавки, красители и подобные материалы и их комбинации, как известно специалисту в данной области техники (смотрите, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, включенную в данный документ посредством ссылки). За исключением случаев, когда любой традиционный носитель несовместим с активным ингредиентом, предусмотрено его применение в фармацевтических композициях.

[369] Фармацевтические композиции могут содержать разные типы носителей в зависимости от того, в какой форме их предстоит вводить - твердой, жидкой или аэрозольной, а также от того, должны ли они быть стерильными для таких путей введения, как инъекция. Описанные в данном документе композиции можно вводить внутривенно, внутривожно, трансдермально, интратекально, внутриартериально, эндоскопически, внутрибрюшинно, интраназально, интравагинально, интаректально, местно, внутримышечно, чрескожно, подкожно, мукозально, перорально, местно, локально, ингаляционно (например, аэрозольная ингаляция), путем инъекции, инфузии, непрерывной инфузии, локализованной перфузии, непосредственно омывающей клетки-мишени, посредством катетера, посредством лаважа, в кремах, в липидных композициях (например, липосомах), регионально путем перфузии, в опухолевое микроокружение, или другим способом или с помощью любой комбинации вышеприведенного, как известно специалисту в данной области техники (смотрите, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, включенную в данный документ посредством ссылки).

Составы и введение

[370] В различных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (например, описанное в данном документе антитело против ВСМА) могут быть включены в фармацевтическую композицию. Такая фармацевтическая композиция может быть применима, например, для предотвращения и/или лечения заболеваний, например, связанного с ВСМА нарушения. Фармацевтические композиции можно составлять способами, известными специалистам в

данной области техники (например, описанными в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th edition, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985)).

[371] Подходящие средства введения можно выбирать на основании возраста и состояния субъекта. Однократная доза фармацевтической композиции, содержащей описанные в данном документе антители или его фрагмент (например, описанное в данном документе антители против ВСМА), может быть выбрана из диапазона от 0,001 до 1000 мг/кг массы тела. С другой стороны доза может быть выбрана в диапазоне от 0,001 до 100000 мг/масса тела, но настоящее изобретение не ограничено такими диапазонами. Доза и способ введения варьируются в зависимости от массы, возраста, состояния и т. п. пациента, и при необходимости могут быть должным образом выбраны специалистами в данной области техники.

[372] В различных вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно составлять так, чтобы она содержала фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, без ограничения, любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие всасывание, и т. п., которые являются физиологически совместимыми. Композиции по настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемую соль, например, соль присоединения кислоты или соль присоединения основания.

[373] В различных вариантах осуществления композицию, содержащую описанное в данном документе антители, например, стерильный состав для инъекций, можно составлять в соответствии с традиционной фармацевтической практикой, используя дистиллированную воду для инъекций в качестве носителя. Например, физиологический солевой раствор или изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие добавки, такие как D-сорбит, D-манноза, D-маннит и хлорид натрия, можно применять в качестве водного раствора для инъекций, необязательно в комбинации с подходящим солюбилизующим агентом, например, спиртом, таким как этанол, и полиспиртом, таким как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, и неионогенным поверхностно-активным веществом, таким как полисорбат 80™, НСО-50 и т. п.

[374] Как описано в данном документе, фармацевтическая композиция может находиться в любой форме, известной в данной области техники. Такие формы включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории.

[375] Выбор или применение любой конкретной формы может частично зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Например, композиции, содержащие композицию, предназначенную для системной или местной доставки, могут находиться в форме растворов для инъекций или инфузий. Соответственно, композиции можно составлять для введения парентеральным способом (например, путем внутривенной, подкожной, внутривнутрибрюшинной или внутримышечной

инъекции). В контексте данного документа парентеральное введение относится к способам введения, отличным от энтерального и местного, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, интраназальную, интраокулярную, легочную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, интрадермальную, внутрилегочную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, эпидуральную, интрацеребральную, интракраниальную, интракаротидную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

[376] Путь введения может быть парентеральным, например, введение путем инъекции, трансназальное введение, транспульмональное введение или чрескожное введение. Введение может быть системным или местным, осуществляемым путем внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, подкожной инъекции.

[377] В различных вариантах осуществления фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно составлять в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для стабильного хранения при высокой концентрации. Стерильные растворы для инъекций можно готовить путем включения композиции, описанной в данном документе, в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. В общем случае дисперсии готовят путем включения композиции, описанной в данном документе, в стерильную несущую среду, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для изготовления стерильных растворов для инъекций, способы изготовления включают вакуумную сушку и сублимационную сушку, которая приводит к получению порошка композиции, описанной в данном документе, плюс любого дополнительного необходимого ингредиента (смотрите ниже) из предварительно стерильно профильтрованного раствора. Надлежащую текучесть раствора можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию реагента, который замедляет всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

[378] Фармацевтическую композицию можно вводить парентерально в форме инъекционного состава, содержащего стерильный раствор или суспензию в воде или другой фармацевтически приемлемой жидкости. Например, фармацевтическую композицию можно составлять путем объединения терапевтической молекулы с фармацевтически приемлемыми носителями или средами, такими как стерильная вода и физиологический солевой раствор, растительное масло, эмульгатор, суспендирующий

агент, поверхностно-активное вещество, стабилизатор, ароматизирующий эксципиент, разбавитель, носитель, консервант, связующее вещество, с последующим смешиванием в единичной лекарственной форме, необходимой в рамках общепринятой фармацевтической практики. Количество активного ингредиента, включенное в фармацевтические препараты, является таким, чтобы обеспечить подходящую дозу в указанном диапазоне. Неограничивающие примеры масляной жидкости включают кунжутное масло и соевое масло, которые можно комбинировать с бензилбензоатом или бензиловым спиртом в качестве солюбилизующего агента. Другие элементы, которые могут быть включены в состав, включают буфер, такой как фосфатный буфер или буфер на основе ацетата натрия, смягчающий агент, такой как гидрохлорид прокаина, стабилизатор, такой как бензиловый спирт или фенол, и антиоксидант. Состав для инъекций может быть упакован в подходящую ампулу.

[379] В некоторых вариантах осуществления композицию можно составлять для хранения при температуре ниже 0 °С (например, -20 °С или -80 °С). Криоконсервированные клетки размораживали и вводили субъекту. Как среды, используемые для криосоставления, проиллюстрированы следующие среды для криоконсервации.

Среда для криоконсервации	Композиция
1	50% PLASMA-LYTE-HEPES + 35% Декстран/Декстроза + 10% HSA + 5% ДМСО
2	40% PLASMA-LYTE A + 50% CS10 + 10% HSA
3	50% MEM-HEPES + 35% Декстран/Декстроза + 10% HSA + 5% ДМСО
4	40% MEM + 50% CS10 + 10% HSA
5	38,6% PLASMA-LYTE A + 50% CS10 + 10% HSA + 0,8% AA+ витамин (0,2% флакон 1 и 0,4% флаконы 2) + 30 мМ трегалозы
6	40% MEM + 50% CS10 + 10% HSA + 1,5 мМ глутатиона
7	40% PLASMA-LYTE A + 50% CS10 + 10% HSA + 1,5 мМ Глутатиона
8	38,6% PLASMA-LYTE A + 50% CS10 + 10% HSA + 0,8% AA+ 0,6% витамина + 1,5 мМ глутатиона
9	40% PLASMA-LYTE A + 50% CS10 + 10% HSA + 30 мМ трегалозы

[380] Каждый компонент, используемый для криосоставления, можно получать из любых коммерчески доступных источников. В качестве неограничивающего примера каждый упомянутый выше компонент можно получить от следующего поставщика:

Компоненты	Поставщик
PLASMA-LYTE A	Baxter
MEM	Thermo Fisher
25% HAS	Shire
Глутатион	Sigma Aldrich
Раствор аминокислоты	Baxter
ДМСО	Origen Biomedical
Витаминный раствор	Baxter
CryoStor® CS10	BioLife Solutions
Трегалоза	J. T. Baker

[381] В некоторых вариантах осуществления композицию можно составлять для хранения в течение до 2 лет (например, в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 года, 1,5 года или 2 лет) при 2-8 °С (например, 4 °С). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции стабильны при хранении в течение по меньшей мере 1 года при 2-8 °С (например, 4 °С).

[382] В конкретных случаях фармацевтическую композицию можно составлять в виде раствора. В некоторых вариантах осуществления композицию можно составлять, например, в виде забуференного раствора подходящей концентрации и подходящего для хранения при 2-8 °С (например, 4 °С).

[383] Композиции, содержащие одно или более сконструированных антител, описанных в данном документе, можно составлять в виде иммунолипосомных композиций. Такие составы можно готовить способами, известными в данной области техники. Липосомы с увеличенным временем нахождения в циркуляции описаны, например, в патенте США № 5013556.

[384] В определенных вариантах осуществления композиции можно составлять с носителем, который будет защищать соединение от быстрого высвобождения, таким как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэферы и полимолочная кислота. Многие способы приготовления таких составов известны в данной области техники. Смотрите, например, J. R. Robinson (1978) "*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*," Marcel Dekker, Inc., New York.

[385] В некоторых вариантах осуществления композиции можно составлять в виде композиции, подходящей для внутрилегочного введения (например, для введения через ингалятор или небулайзер) млекопитающему, такому как человек. Способы составления таких композиций хорошо известны в данной области техники. Составы для ингаляторов сухого порошка и подходящие системы для введения составов также известны в данной

области техники. Легочное введение может быть пероральным и/или назальным. Примеры фармацевтических устройств для доставки в легкие включают дозирующие ингаляторы, ингаляторы сухого порошка (DPI) и небулайзеры. Например, описанную в данном документе композицию можно вводить в легкие субъекта с помощью ингалятора сухого порошка. Эти ингаляторы представляют собой устройства без пропеллента, которые доставляют диспергируемые и стабильные сухие порошковые композиции в легкие. Ингаляторы сухого порошка хорошо известны в области медицины и включают, без ограничения: TURBOHALER® (AstraZeneca; London, England), ингалятор AIR® (ALKERMES®; Cambridge, Mass.); ROTAHALER® (GlaxoSmithKline; London, England); и ECLIPSE™ (Sanofi-Aventis; Paris, France). Также смотрите, например, публикации PCT №№ WO 04/026380, WO 04/024156 и WO 01/78693. Устройства DPI использовали для легочного введения полипептидов, таких как инсулин и гормон роста. В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе композицию можно вводить внутрилегочно с помощью ингалятора отмеренных доз. В этих ингаляторах для доставки дискретной дозы соединения в легкие используется пропеллент. Дополнительные устройства и способы внутрилегочного введения изложены, например, в публикациях патентных заявок США №№ 20050271660 и 20090110679, содержание каждой из которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

[386] В некоторых вариантах осуществления композиции можно составлять для доставки в глаз, например, в форме фармацевтически приемлемого раствора, суспензии или мази. Препарат для лечения глаз может находиться в форме стерильного водного раствора, содержащего, например, дополнительные ингредиенты, такие как, но не ограничиваясь этим, консерванты, буферы, тонизирующие агенты, антиоксиданты и стабилизаторы, неионные смачивающие или осветляющие агенты и агенты, повышающие вязкость. Препарат, описанный в данном документе, можно вводить местно в глаз субъекта, нуждающегося в лечении (например, субъекта, страдающего ВМД), традиционными способами, например, в форме капель или ванночек для глаз, с применением терапевтического раствора, содержащего одну или более композиций.

[387] В определенных вариантах осуществления для введения композиции, описанной в данном документе, могут подходить различные устройства для введения лекарственных средств в витреальную полость глаза. Например, в публикации США № 2002/0026176 описан obturator слезного канальца, содержащий фармацевтический препарат, который можно вводить через склеру таким образом, чтобы он заходил в полость стекловидного тела и доставлял фармацевтический препарат в полость стекловидного тела. В другом примере в патенте США № 5443505 описано имплантируемое устройство для введения в супрахориоидальное пространство или бессосудистую область для замедленного высвобождения лекарственного средства во внутренние структуры глаза. В каждом из патентов США №№ 5773019 и 6001386 описано имплантируемое устройство для доставки лекарственного препарата, прикрепляемое к склеральной поверхности глаза. Дополнительные способы и устройства (например,

транссклеральный пластырь и доставка через контактные линзы) для доставки терапевтического агента в глаз описаны, например, в Ambati and Adamis (2002) *Prog Retin Eye Res* 21(2):145-151; Ranta and Urtti (2006) *Adv Drug Delivery Rev* 58(11):1164-1181; Barocas and Balachandran (2008) *Expert Opin Drug Delivery* 5(1):1-10(10); Gulsen and Chauhan (2004) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2342-2347; Kim et al. (2007) *Ophthalmic Res* 39:244-254; и публикации РСТ № WO 04/073551, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

[388] В определенных вариантах осуществления введение описанного в данном документе антитела обеспечивают путем введения субъекту нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело. Нуклеиновые кислоты, кодирующие описанное в данном документе терапевтическое антитело, могут быть включены в генную конструкцию для применения в рамках протокола генной терапии для доставки нуклеиновых кислот, которые можно использовать для экспрессии и выработки антитела в клетках. Экспрессионные конструкции таких компонентов можно вводить в любом терапевтически эффективном носителе, например, в любых составе или композиции, способных эффективно доставлять компонент гена в клетки *in vivo*. Подходы включают вставку соответствующего гена в вирусные векторы, включая рекомбинантные ретровирусы, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус и вирус простого герпеса 1 (HSV-1), или рекомбинантные бактериальные или эукариотические плазмиды. Вирусные векторы могут трансфицировать клетки напрямую; плазмидную ДНК можно доставлять с помощью, например, катионных липосом (липофектин) или дериватизированных, полилизиновых конъюгатов, грамицидина S, искусственных вирусных оболочек или других подобных внутриклеточных носителей, а также прямой инъекции генной конструкции или осаждения CaPO_4 (смотрите, например, WO04/060407). Примеры подходящих ретровирусов включают pLJ, pZIP, pWE и pEM, которые известны специалистам в данной области техники (смотрите, например, 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; патенты США №№ 4868116 и 4980286; и публикации РСТ №№ WO89/07136, WO89/02468, WO89/05345 и WO92/07573). В другой системе доставки вирусных генов используются полученные из аденовирусов векторы (смотрите, например, Berkner et al. (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434; и Rosenfeld et al. (1992) *Cell* 68:143-155). Подходящие аденовирусные векторы, полученные из штамма аденовируса Ad типа 5 dl324 или других штаммов аденовируса (например, Ad2, Ad3, Ad7 и т. д.), известны специалистам в данной области техники. Другой вирусной системой, подходящей для доставки соответствующего гена, является

аденоассоциированный вирус (AAV). Смотрите, например, Flotte et al. (1992) *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:349-356; Samulski et al. (1989) *J Virol* 63:3822-3828; и McLaughlin et al. (1989) *J Virol* 62:1963-1973.

[389] В различных вариантах осуществления подкожное введение можно осуществлять с помощью устройства, такого как шприц, предварительно заполненный шприц, автоинжектор (например, одноразовый или многоразовый), шприц-ручка, пластыревый инжектор, портативный инжектор, амбулаторный шприцевой инфузионный насос с наборами для подкожной инфузии или другого устройства для объединения с лекарственным антителом для подкожной инъекции.

[390] В инъекционной системе по настоящему изобретению может использоваться ручка для доставки, описанная в патенте США № 5308341. Устройства-ручки, чаще всего используемые для самостоятельного введения инсулина пациентам с диабетом, хорошо известны в данной области техники. Такие устройства могут содержать по меньшей мере одну инъекционную иглу (например, иглу 31-го калибра длиной около 5-8 мм), как правило, предварительно заполненную одной или более терапевтическими единичными дозами терапевтического раствора, и применимы для быстрого введения раствора субъекту с минимальными, насколько это возможно, болевыми ощущениями. Одна ручка для доставки лекарственных препаратов содержит держатель флакона, в который может быть помещен флакон с терапевтическим или другим лекарственным препаратом. Ручка может быть полностью механическим устройством или сочетаться с электронной схемой для точной установки и/или указания дозировки лекарственного препарата, которую вводят пользователю. Смотрите, например, патент США № 6192891. В некоторых вариантах осуществления игла устройства-ручки является одноразовой, а наборы содержат одну или более одноразовых сменных игл. Устройства-ручки, подходящие для доставки любой из представленных композиций, также описаны, например, в патентах США №№ 6277099; 6200296 и 6146361, содержание каждого из которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Микроигольное устройство-ручка описано, например, в патенте США № 7556615, содержание которого в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Также смотрите устройство точного шприца-ручки (PPI), MOLLY™, производимое Scandinavian Health Ltd.

[391] В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в данном документе, можно терапевтически доставлять субъекту путем местного введения. В контексте данного документа термины «местное введение» или «местная доставка» могут относиться к доставке, которая не зависит от переноса композиции или агента в предполагаемые целевые ткани или участок через сосудистую систему. Например, композицию можно доставлять путем инъекции или имплантации композиции или агента или путем инъекции или имплантации устройства, содержащего композицию или агент. В определенных вариантах осуществления после местного введения вблизи целевых тканей или участка композиция или агент, или один или большее количество из их компонентов, могут диффундировать к предполагаемым целевым тканям или участку, которые не

являются местом введения.

[392] В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе композиции представлены в виде единичной лекарственной формы, причем единичная лекарственная форма может подходить для самостоятельного введения. Такая единичная лекарственная форма может поставляться в контейнере, как правило, например, во флаконе, картридже, предварительно заполненном шприце или одноразовом шприце-ручке. Также можно использовать дозатор, такой как дозирующее устройство, описанное в патенте США № 6302855, например, с инъекционной системой, как описано в данном документе.

[393] Подходящая доза описанной в данном документе композиции, которая способна обеспечивать лечение или предотвращение нарушения у субъекта, может зависеть от ряда факторов, включая, например, возраст, пол и массу тела субъекта, подлежащего лечению, и конкретное используемое ингибирующее соединение. Например, для лечения субъекта со связанным с ВСМА нарушением может быть необходима отличная доза одной композиции, содержащей описанное в данном документе антитело, по сравнению с дозой отличного состава этого антитела. Другие факторы, влияющие на вводимую субъекту дозу, включают, например, тип или тяжесть нарушения. Например, для субъекта, имеющего одно связанное с ВСМА нарушение, может быть необходимо введение отличной дозировки, чем для субъекта с другим связанным с ВСМА нарушением. Другие факторы могут включать, например, другие клинические нарушения, которые присутствуют у субъекта одновременно или присутствовали ранее, общее состояние здоровья субъекта, генетическую предрасположенность субъекта, рацион, время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных препаратов и любых других дополнительных терапевтических средств, которые вводят субъекту. Также следует понимать, что конкретную дозировку и схему лечения для любого конкретного субъекта также можно корректировать на основании заключения лечащего врача.

[394] В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе композицию вводят в виде фиксированной дозы или в дозе, выраженной в миллиграммах на килограмм (мг/кг). В некоторых вариантах осуществления дозу выбирают так, чтобы снизить или избежать выработки антител или других иммунных ответов хозяина против одного или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции. Хотя это ни в коем случае не подразумевает ограничения, типовые дозировки антитела, такого как описанная в данном документе композиция, включают, например, 1-1000 мг/кг, 1-100 мг/кг, 0,5-50 мг/кг, 0,1-100 мг/кг, 0,5-25 мг/кг, 1-20 мг/кг и 1-10 мг/кг. Типовые дозировки описанной в данном документе композиции, включают, без ограничения, 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4 мг/кг, 8 мг/кг или 20 мг/кг.

[395] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в дозировке и с интервалом введения, достаточных для уменьшения или лечения одного или более симптомов заболевания, связанного с аберрантной экспрессией ВСМА. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят каждый день, дважды в день, один раз в

неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в 2 месяца, один раз в 6 месяцев или один раз в год. В некоторых вариантах осуществления лечение включает однократное введение антитела.

[396] В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую один или более эксципиентов.

[397] Фармацевтический раствор может содержать терапевтически эффективное количество описанной в данном документе композиции. Специалист в данной области техники может легко определить такие эффективные количества, частично на основании эффекта вводимой композиции или комбинированного эффекта композиции и одного или более дополнительных активных агентов, если используют более одного агента. Терапевтически эффективное количество описанной в данном документе композиции также может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивида, а также способность композиции (и одного или более дополнительных агентов) вызывать необходимый ответ у индивида, например, облегчение по меньшей мере одного параметра состояния, например, облегчение по меньшей мере одного симптома связанного с ВСМА нарушения. Например, терапевтически эффективное количество описанной в данном документе композиции может ингибировать (уменьшать тяжесть или устранять его появление) и/или предотвращать конкретное нарушение и/или один или более симптомов конкретного нарушения, известного в данной области техники или описанного в данном документе. Терапевтически эффективное количество также является таким, при котором любые токсичные или вредные эффекты композиции перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

[398] Подходящие для человека дозы любых из описанных в данном документе композиций можно дополнительно оценивать, например, в исследованиях фазы I с повышением дозы. Смотрите, например, van Gorp et al. (2008) *Am J Transplantation* 8(8):1711-1718; Hanouska et al. (2007) *Clin Cancer Res* 13(2, part 1):523-531; и Hetherington et al. (2006) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(10): 3499-3500.

[399] Токсичность и терапевтическую эффективность композиций можно определять с помощью известных фармацевтических процедур в клеточных культурах или на экспериментальных животных (например, животных моделях любого из связанных с ВСМА нарушений). Эти процедуры можно использовать, например, для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной в 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс, который может быть выражен как соотношение LD₅₀/ED₅₀. Предпочтительной является описанная в данном документе композиция, которая демонстрирует высокий терапевтический индекс. Хотя можно использовать композиции, демонстрирующие токсичные побочные эффекты, следует позаботиться о разработке системы доставки, которая нацеливает такие соединения на участок пораженной ткани и минимизирует потенциальное повреждение нормальных клеток и, таким образом, снижает побочные эффекты.

[400] Специалистам в данной области техники будет понятно, что данные, полученные из анализов клеточных культур и исследований на животных, можно использовать при составлении диапазона дозировок для применения на людях. Соответствующие дозировки описанных в данном документе композиций в общем случае находятся в пределах диапазона циркулирующих концентраций композиций, который включает ED₅₀ с небольшой или отсутствующей токсичностью. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для описанной в данном документе композиции терапевтически эффективную дозу можно изначально оценить из анализов клеточных культур. Дозу можно составлять, используя животные модели, для достижения диапазона циркулирующей плазменной концентрации, который включает I₀ (т. е. концентрацию антитела, которая обеспечивает полумаксимальное ингибирование симптомов), определенную в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения доз, применимых для людей. Уровни в плазме можно измерять, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, например, когда необходимо местное введение (например, в глаз или сустав), можно использовать клеточную культуру или животную модель для определения дозы, необходимой для обеспечения терапевтически эффективной концентрации в локальном участке.

Комбинированная терапия

[401] В соответствии с настоящим изобретением антитела, антигенсвязывающие фрагменты, CAR, векторы и клетки, экспрессирующие CAR, а также композиции, описанные в данном документе, можно использовать в комбинации с другими видами терапии для лечения рака.

[402] В различных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело против ВСМА может быть включено в курс лечения, который дополнительно включает введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного агента. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с описанным в данном документе антителом к ВСМА, может представлять собой химиотерапевтический агент.

[403] В некоторых вариантах осуществления антитела к ВСМА, их фрагменты могут быть конъюгированы (например, связаны) с терапевтическим агентом (например, химиотерапевтическим агентом и радиоактивным атомом) для связывания с раковой клеткой, доставки терапевтического агента в раковую клетку и уничтожения раковой клетки, которая экспрессирует ВСМА человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против ВСМА связано с терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, цитокин, радиоактивный атом, миРНК или токсин. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой радиоактивный

атом.

[404] В некоторых вариантах осуществления способы можно проводить в сочетании с другими видами терапии для связанных с ВСМА нарушений. Например, композицию можно вводить субъекту одновременно, до или после химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить субъекту одновременно, до или после способа адоптивной терапии.

[405] В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с описанным в данном документе антителом к ВСМА, можно вводить одновременно с антителом к ВСМА, в один день с антителом к ВСМА или в одну неделю с антителом к ВСМА. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с описанным в данном документе антителом к ВСМА, можно вводить в одном составе с антителом к ВСМА. В определенных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый образом, временно разделенным с введением описанного в данном документе антитела к ВСМА, например, за или через один или более часов, за или через один или более дней, за или через одну или более недель или за или через один или более месяцев относительно введения антитела к ВСМА. В различных вариантах осуществления частота введения одного или более дополнительных агентов может быть такой же, схожей или отличной от частоты введения описанного в данном документе антитела к ВСМА.

[406] Комбинированная терапия охватывает схему лечения, которая включает введение двух разных антител, описанных в данном документе, и/или схему лечения, которая включает введение антитела, описанного в данном документе, с помощью нескольких составов и/или путей введения.

[407] В некоторых вариантах осуществления композиции можно составлять с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, например, дополнительными видами терапии для лечения или предотвращения связанного с ВСМА нарушения (например, рака или аутоиммунного нарушения) у субъекта. Дополнительные агенты для лечения связанного с ВСМА нарушения у субъекта будут варьироваться в зависимости от конкретного нарушения, подлежащего лечению, но могут включать, без ограничения, ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизон, осфамид, карбоплатин, этопозид, дексаметазон, цитарабин, цисплатин, циклофосфамид или флударабин.

[408] Описанная в данном документе композиция может замещать или дополнять терапию, применяемую ранее или на данный момент. Например, после лечения описанной в данном документе композицией введение одного или более дополнительных активных агентов можно прекратить или снизить, например, вводить их при меньших уровнях, например, меньших уровнях эталонного антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание с ВСМА, после введения описанного в данном документе антитела к ВСМА. В некоторых вариантах осуществления применение предшествующей терапии можно поддерживать. В некоторых вариантах осуществления предшествующую терапию можно

поддерживать до тех пор, пока уровень композиции не достигнет уровня, достаточного для обеспечения терапевтического эффекта. Два варианта терапии можно применять в комбинации.

[409] В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящим вариантам осуществления включают популяцию иммунных клеток (включая популяцию НК-клеток) в комбинации с по меньшей мере одним видом дополнительной терапии. Дополнительная терапия может представлять собой лучевую терапию, хирургическое вмешательство (например, люмпэктомию и мастэктомию), химиотерапию, генную терапию, ДНК-терапию, вирусную терапию, РНК-терапию, иммунотерапию, трансплантацию костного мозга, нанотерапию, терапию моноклональными антителами, гормональную терапию, онколитические вирусы или комбинацию вышеперечисленного. Дополнительная терапия может иметь форму адьювантной или неоадьювантной терапии.

[410] В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой введение низкомолекулярного ферментативного ингибитора или антиметастатического агента. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой введение агентов, ограничивающих побочные эффекты (например, агентов, предназначенных для снижения частоты и/или тяжести побочных эффектов лечения, таких как агенты от тошноты). В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой лучевую терапию. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой хирургическое вмешательство. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой комбинацию лучевой терапии и хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой гамма-облучение. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой терапию, нацеленную на путь РВК/АКТ/mTOR, ингибитор HSP90, ингибитор тубулина, ингибитор апоптоза и/или химиопреентивный агент. Дополнительная терапия может представлять собой один или более химиотерапевтических агентов, известных в данной области техники.

[411] В конкретных вариантах осуществления в дополнение к клеточной терапии по изобретению, индивиду могла быть предоставлена, может быть предоставлена и/или будет предоставлена конкретная дополнительная терапия рака, включая одно или более из хирургического вмешательства, облучения, иммунотерапии (отличной от клеточной терапии по настоящему изобретению), гормональной терапии, генной терапии, химиотерапии и т. д.

[412] Терапию иммунными клетками можно применять до, во время, после или в различных комбинациях относительно дополнительной противораковой терапии. Введение можно проводить с интервалами в диапазоне от одновременного до минут, дней и недель. В вариантах осуществления, в которых терапия иммунными клетками предоставляется пациенту отдельно от дополнительного терапевтического агента, в общем случае следует следить за тем, чтобы между моментом каждой доставки не

протекал значительный период времени так, чтобы два соединения по-прежнему были способны оказывать преимущественный комбинированный эффект на пациента. В таких случаях предполагается, что пациент может получать терапию антителами и противораковую терапию в течение около 12-24 или 72 ч друг от друга и, в частности, в течение около 6-12 ч друг от друга. В некоторых ситуациях может быть желательно значительно продлить период лечения, когда между соответствующими введениями проходит от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

[413] Можно использовать различные комбинации. В примере ниже терапия иммунными клетками обозначена «А», а противораковая терапия обозначена «В»:

A/V/A V/A/V V/V/A A/A/V A/V/V V/A/A A/V/V/V V/A/V/V

V/V/V/A V/V/A/V A/A/V/V A/V/A/V A/V/V/A V/V/A/A

V/A/V/A V/A/A/V A/A/A/V V/A/A/A A/V/A/A A/A/V/A

[414] Введение пациенту любых соединения или клеточной терапии по настоящим вариантам осуществления будут проводить согласно общим протоколам для введения таких соединения, принимая во внимание токсичность агентов, если она имеется. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления присутствует этап отслеживания токсичности, связанной с комбинированной терапией.

Химиотерапия

[415] В соответствии с настоящими вариантами осуществления можно использовать широкий спектр химиотерапевтических агентов. Термин «химиотерапия» относится к использованию лекарственных препаратов для лечения рака. Термин «химиотерапевтический агент» используют для обозначения соединения или композиции, которые вводят при лечении рака. Эти агенты или лекарственные препараты классифицируют по способу их действия в клетке, например того, влияют ли они на клеточный цикл и на какой стадии. В альтернативном варианте агент можно охарактеризовать на основании его способности напрямую перекрестно связывать ДНК, интеркалировать в ДНК или индуцировать хромосомные и митотические аберрации, влияя на синтез нуклеиновых кислот.

[416] Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоккон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид,

мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трюфосфамид и урациловый иприт; нитромочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II); динемидин, включая динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромофоры на основе хромопротеинов эндиинового антибиотика, аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабин, карминомицин, карцинофилин, хромомицин, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин (включая морфолино-доксорубин, цианоморфолино-доксорубин, 2-пирролино-доксорубин и дезоксидоксорубин), эпирубин, эзрубин, идарубин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицин, пепломицин, потфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностин и зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, птероптерин и триметотрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан и тестостерон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как митоган и трилостан; наполнитель фолиевой кислоты, такой как фолиевая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминоклевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатрексат; дефамин; демеколцин; диазиквон; эльфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразин; пентостатин; фенамет; пирарубин; лосоксантрон; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс ПСК; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; теназоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотечены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ага-С»); циклофосфамид; таксоиды, например, паклитаксел и доцетаксел, гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; координационные комплексы платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселоду; ибандронат; иринотекан (например, СРТ-11); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (ДФМО); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; карбоплатин, прокарбазин, пликомицин, гемцитабин, навельбин, ингибиторы фарнезил-протеинтрансферазы, трансплатин и фармацевтически приемлемые

соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного.

В. Лучевая терапия

[417] Другие факторы, вызывающие повреждение ДНК и широко используемые, включают так называемое γ -излучение, рентгеновское излучение и/или направленную доставку радиоизотопов к опухолевым клеткам. Предусмотрены и другие формы повреждающих ДНК факторов, такие как микроволны, облучение протонным пучком (патенты США 5760395 и 4870287) и УФ-облучение. Наиболее вероятно, что все эти факторы вызывают широкий спектр повреждений ДНК, предшественников ДНК, нарушений репликации и репарации ДНК, а также сборки и поддержания хромосом. Диапазон доз рентгеновского излучения варьируется от ежедневных доз от 50 до 200 рентген в течение длительного периода времени (от 3 до 4 недель) до разовых доз от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны доз радиоизотопов широко варьируются и зависят от периода полураспада изотопа, силы и типа испускаемого излучения, а также от поглощения неопластическими клетками.

С. Иммунотерапия

[418] Специалисту в данной области техники будет понятно, что в комбинации или в сочетании со способами по вариантам осуществления можно использовать дополнительные варианты иммунотерапии. В контексте лечения рака иммунотерапия в общем случае основана на использовании иммунных эффекторных клеток и молекул для нацеливания на раковые клетки и их разрушения. Ритуксимаб (РИТУКСАН®) является таким примером. Иммунным эффектором может быть, например, антитело, специфическое в отношении какого-либо маркера на поверхности опухолевой клетки. Антитело само может служить эффектором терапии или оно может рекрутировать другие клетки для фактического осуществления уничтожения клеток. Антитело также может быть конъюгировано с лекарственным препаратом или токсином (химиотерапевтическим средством, радионуклидом, А-цепью рицина, холерным токсином, коклюшным токсином и т. д.) и служить в качестве нацеливающего агента. В альтернативном варианте эффектором может быть лимфоцит, несущий поверхностную молекулу, которая взаимодействует, прямо или непрямо, с опухолевой клеткой-мишенью. Различные эффекторные клетки включают цитотоксические Т-клетки и NK-клетки.

[419] Конъюгаты антитело - лекарственный препарат стали революционным подходом к разработке противораковых терапевтических средств. Рак является одной из основных причин смерти в мире. Конъюгаты антитело - лекарственный препарат (ADC) содержат моноклональные антитела (MAb), которые ковалентно связаны с лекарственными препаратами, уничтожающими клетки. Этот подход сочетает высокую специфичность MAb в отношении их антигенных мишеней с сильнодействующими цитотоксическими препаратами, что приводит к получению «вооруженных» MAb, которые доставляют полезную нагрузку (лекарственный препарат) к опухолевым клеткам с повышенными уровнями антигена. Направленная доставка препарата также сводит к минимуму его воздействие на нормальные ткани, что приводит к снижению токсичности

и улучшению терапевтического индекса. Одобрение FDA двух препаратов ADC, АДЦЕТРИС® (брентуксимаб ведотин) в 2011 г. и КАДСИЛА® (трастузумаб эмтанзин или T-DM1) в 2013 г., подтвердило эффективность этого подхода. В настоящее время более 30 препаратов-кандидатов ADC находятся на различных стадиях клинических исследований для лечения рака (Leal et al., 2014). Поскольку конструирование антител и оптимизация полезной нагрузки и линкера становятся все более и более усовершенствованными, открытие и разработка новых ADC все больше зависят от идентификации и валидации новых мишеней, пригодных для этого подхода, и создания нацеливающих МАб. Двумя критериями мишеней ADC являются повышенная регуляция/высокий уровень экспрессии в опухолевых клетках и эффективная интернализация.

[420] В одном аспекте иммунотерапии опухолевая клетка должна нести какой-либо маркер, пригодный для нацеливания, т. е. не присутствующий в большинстве других клеток. Существует множество опухолевых маркеров, и любой из них может подходить для нацеливания в контексте представленных вариантов осуществления. Обычные опухолевые маркеры включают CD20, карциноэмбриональный антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, сиалиновый антиген Льюиса, MucA, MucB, PLAP, рецептор ламинина, erb B и p155. Альтернативным аспектом иммунотерапии является комбинация противоракового эффекта с иммуностимулирующими эффектами. Существуют также молекулы, стимулирующие иммунитет, включая цитокины, такие как IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, гамма-IFN, хемокины, такие как MIP-1, MCP-1, IL-8, и факторы роста, такие как лиганд FLT3.

[421] Примерами вариантов иммунотерапии, которые на данный момент проходят исследования или находятся в употреблении, являются иммунные адъюванты, например, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, динитрохлорбензол и ароматические соединения (патенты США 5801005 и 5739169; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998); цитокиновая терапия, например, интерфероны α , β и γ , IL-1, GM-CSF и TNF (Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998); генная терапия, например, TNF, IL-1, IL-2 и p53 (Qin et al., 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; патенты США 5830880 и 5846945); и моноклональные антитела, например, антитело к CD20, антитело к ганглиозиду GM2 и антитело p185 (Hollander, 2012; Hanibuchi et al., 1998; патент США 5824311). Предусмотрено, что вместе с описанными в данном документе вариантами терапии на основе антител можно использовать один или более вариантов противораковой терапии.

[422] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия может представлять собой ингибитор иммунных контрольных точек. Иммунные контрольные точки усиливают сигнал (например, костимулирующие молекулы) или ослабляют сигнал. Ингибирующие иммунные контрольные точки, на которые может быть нацелена блокада иммунных контрольных точек, включают аденозиновый рецептор A2A (A2AR), B7-H3 (также известный как CD276), аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA), ассоциированный

с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок 4 (CTLA-4, также известный как CD152), индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), иммуноглобулин клеток-киллеров (KIR), ген активации лимфоцитов 3 (LAG3), белок запрограммированной гибели 1 (PD-1), Т-клеточный домен иммуноглобулина и домен муцина 3 (TIM-3) и V-домен Ig-супрессора активации Т-клеток (VISTA). В частности, ингибиторы иммунных контрольных точек нацелены на ось PD-1 и/или CTLA-4.

[423] Ингибиторы иммунных контрольных точек могут представлять собой лекарственные препараты, такие как малые молекулы, рекомбинантные формы лигандов или рецепторов, или, в частности, антитела, такие как человеческие антитела (например, международная патентная публикация WO2015016718; Pardoll, Nat Rev Cancer, 12(4): 252-64, 2012; обе включены в данный документ посредством ссылки). Можно использовать известные ингибиторы белков иммунных контрольных точек или их аналоги, в частности, можно использовать химеризованные, гуманизированные или человеческие формы антител. Как известно специалистам, в случае определенных антител, упомянутых в настоящем изобретении, можно использовать альтернативные и/или эквивалентные названия. Такие альтернативные и/или эквивалентные названия являются взаимозаменяемыми в контексте настоящего изобретения. Например, известно, что ламбролизумаб также известен под альтернативными и эквивалентными названиями МК-3475 и пембролизумаб.

[424] В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PD-1 с его лигандами-партнерами по связыванию. В конкретном аспекте лигандами-партнерами по связыванию PD-1 являются PDL1 и/или PDL2. В другом варианте осуществления антагонист связывания PDL1 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PDL1 с его партнерами по связыванию. В конкретном аспекте партнерами по связыванию PDL1 являются PD-1 и/или B7-1. В другом варианте осуществления антагонист связывания PDL2 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PDL2 с его партнерами по связыванию. В конкретном аспекте партнером по связыванию PDL2 является PD-1. Антагонист может представлять собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноадгезин, слитый белок или олигопептид. Типовые антитела описаны в патентах США №№ US8735553, US8354509 и US8008449, которые все включены в данный документ посредством ссылки. Другие антагонисты оси PD-1 для применения в способах, предложенных в данном документе, известны в данной области техники, например, описаны в патентных заявках США №№ US20140294898, US2014022021 и US20110008369, которые все включены в данный документ посредством ссылки.

[425] В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой антитело к PD-1 (например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба и CT-011. В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой

иммуноадгезин (например, иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или PD-1-связывающую часть PDL1 или PDL2, слитую с константной областью (например, Fc-областью последовательности иммуноглобулина)). В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой AMP-224. Ниволумаб, также известный как MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 и ОПДИВО®, представляет собой антитело к PD-1, описанное в WO2006/121168. Пембролизумаб, также известный как MK-3475, Merck 3475, ламбролизумаб, KEYТРУДА® и SCH-900475, представляет собой антитело к PD-1, описанное в WO2009/114335. CT-011, также известный как hBAT или hBAT-1, представляет собой антитело к PD-1, описанное в WO2009/101611. AMP-224, также известный как B7-DCIg, представляет собой PDL2-Fc-слитый растворимый рецептор, описанный в WO2010/027827 и WO2011/066342.

[426] Другой иммунной контрольной точкой, которая может быть мишенью в способах, предложенных в данном документе, является ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок 4 (CTLA-4), также известный как CD152. Полная последовательность кДНК человеческого CTLA-4 имеет номер доступа Genbank L15006. CTLA-4 находится на поверхности Т-клеток и действует как «выключатель», когда он связан с CD80 или CD86 на поверхности антигенпрезентирующих клеток. CTLA4 является членом суперсемейства иммуноглобулинов, который экспрессируется на поверхности хелперных Т-клеток и передает ингибирующий сигнал Т-клеткам. CTLA4 является сходным с костимулирующим белком Т-клеток, CD28, где молекулы связываются с CD80 и CD86, также называемыми B7-1 и B7-2, соответственно, на антигенпрезентирующих клетках. CTLA4 передает Т-клеткам ингибирующий сигнал, в то время как CD28 передает стимулирующий сигнал. Внутриклеточный CTLA4 также присутствует в регуляторных Т-клетках и может быть важен для их функции. Активация Т-клеток через Т-клеточный рецептор и CD28 приводит к повышению экспрессии CTLA-4, ингибирующего рецептора для молекул B7.

[427] В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой антитело к CTLA-4 (например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело), его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноадгезин, слитый белок или олигопептид.

[428] Антитела к CTLA-4 человека (или полученные из них домены VH и/или VL), подходящие для применения в представленных способах, можно получать, используя способы, хорошо известные в данной области техники. В альтернативном варианте можно использовать признанные в данной области техники антитела к CTLA-4. Например, антитела к CTLA-4, описанные в: US 8119129, WO 01/14424, WO 98/42752; WO 00/37504 (CP675,206, также известный как тремелидумаб; в прошлом тицилимумаб), патенте США № 6207156; Hurwitz et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(17): 10067-10071; Camacho et al. (2004) J Clin Oncology 22(145): Abstract No. 2505 (антитело CP-675206); и Mokyr et al. (1998) Cancer Res 58:5301-5304, можно использовать в способах, описанных в данном документе. Информация каждой из вышеупомянутых публикаций включена в данный документ.

документ посредством ссылки. Также можно использовать антитела, которые конкурируют с любыми из этих признанных в данной области техники антител за связывание с CTLA-4. Например, гуманизованное антитело к CTLA-4 описано в международных патентных заявках №№ WO2001014424, WO2000037504 и патенте США № 8017114; которые все включены в данный документ посредством ссылки.

[429] Типовым антителом к CTLA-4 является ипилимумаб (также известный как 10D1, MDX-010, MDX-101 и Ервой®) или его антигенсвязывающие фрагменты и варианты (смотрите, например, WO 01/14424). В других вариантах осуществления антитело содержит CDR или VR тяжелой и легкой цепи ипилимумаба. Соответственно, в одном варианте осуществления антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 VH-области ипилимумаба и домены CDR1, CDR2 и CDR3 VL-области ипилимумаба. В другом варианте осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на CTLA-4, что и вышеупомянутые антитела. В другом варианте осуществления антитело имеет по меньшей мере около 90% идентичности аминокислотной последовательности варибельной области с вышеупомянутыми антителами (например, по меньшей мере около 90%, 95% или 99% идентичности варибельной области с ипилимумабом).

[430] Другие молекулы для модуляции CTLA-4 включают лиганды и рецепторы CTLA-4, такие как описанные в патентах США №№ US5844905, US5885796 и международных патентных заявках №№ WO1995001994 и WO1998042752; которые все включены в данный документ посредством ссылки, и иммуоадгезины, такие как описанные в патенте США № US8329867, включенном в данный документ посредством ссылки.

D. Хирургическое вмешательство

[431] Примерно 60% людей с раком подвергаются хирургическому вмешательству того или иного типа, которое включает профилактическое, диагностическое или стадирующее, лечебное и паллиативное хирургическое вмешательство. Лечебное хирургическое вмешательство включает резекцию, когда физически удаляют, иссекают и/или уничтожают всю или часть раковой ткани, и его можно использовать в сочетании с другими методами лечения, такими как лечение по настоящим вариантам осуществления, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, генная терапия, иммунотерапия и/или альтернативные варианты терапии. Резекция опухоли означает физическое удаление по меньшей мере части опухоли. Помимо резекции опухоли, лечение посредством хирургического вмешательства включает лазерную хирургию, криохиргию, электрохиргию и микроскопически контролируруемую хирургию (операция Мооса).

[432] После иссечения части или всех раковых клеток, тканей или опухоли в организме может образоваться полость. Лечение можно осуществлять путем перфузии, прямой инъекции или местного применения дополнительного варианта противораковой терапии. Такое лечение можно повторять, например, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, или каждые 1, 2, 3, 4 и 5 недель, или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. Это

лечение также может иметь разные дозировки.

Е. Рекомбинантная генная технология

[433] В соответствии с настоящим изобретением можно использовать традиционные методики молекулярной биологии, микробиологии и рекомбинантных ДНК, известные в данной области техники. Такие методики описаны в литературе (смотрите, например, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F. M. Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

[434] Рекомбинантная экспрессия гена, такого как нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, такой как описанное в данном документе антитело против ВСМА, может включать конструирование экспрессионного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид. В некоторых вариантах осуществления последовательности нуклеиновых кислот ВСМА могут быть кодон-оптимизированными последовательностями для экспрессии в клетках млекопитающих. После получения полинуклеотида можно получать вектор для выработки полипептида с помощью технологии рекомбинантной ДНК, используя методики, известные в данной области техники. Для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующие полипептид последовательности и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции, можно использовать известные способы. Эти способы включают, например, *in vitro* методики рекомбинантных ДНК, методики синтеза и *in vivo* генетическую рекомбинацию.

[435] Экспрессионный вектор можно переносить в клетку-хозяина с помощью традиционных методик, а трансфицированные клетки можно культивировать с помощью традиционных методик для получения полипептидов. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. Кроме того, материалы, способы и примеры являются иллюстративными и не носят ограничительного характера. Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно подразумевается рядовым специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, можно использовать на практике или при тестировании данного изобретения, подходящие способы и материалы описаны в данном документе.

Ф. Другие агенты

[436] Предусмотрено, что в комбинации с определенными аспектами настоящих

вариантов осуществления можно использовать другие агенты для повышения терапевтической эффективности лечения. Эти дополнительные агенты включают агенты, которые влияют на регуляцию рецепторов клеточной поверхности и GAP-соединений, цитостатические и дифференцирующие агенты, ингибиторы клеточной адгезии, агенты, которые повышают чувствительность гиперпролиферативных клеток к индукторам апоптоза, или другие биологические агенты. Усиление межклеточной сигнализации за счет увеличения количества GAP-соединений усилит антигиперпролиферативные эффекты на соседнюю популяцию гиперпролиферативных клеток. В других вариантах осуществления можно использовать цитостатические или дифференцирующие агенты в комбинации с определенными аспектами настоящих вариантов осуществления для повышения антигиперпролиферативной эффективности вариантов лечения. Для повышения эффективности настоящих вариантов осуществления предусмотрено применение ингибиторов клеточной адгезии. Примерами ингибиторов клеточной адгезии являются ингибиторы киназы фокальной адгезии (ФАК) и ловастатин. Дополнительно предусмотрено, что другие агенты, повышающие чувствительность гиперпролиферативных клеток к апоптозу, такие как антитело с225, можно использовать в комбинации с некоторыми аспектами настоящих вариантов осуществления для повышения эффективности лечения.

Наборы по изобретению

[437] Любые из описанных в данном документе композиций могут быть представлены в наборе. В неограничивающем примере клетки, реагенты для получения клеток, векторы и реагенты для получения векторов и/или их компонентов могут быть представлены в наборе. В определенных вариантах осуществления НК-клетки могут быть представлены в наборе, где они могут экспрессировать или еще нет ВСМА-CAR, содержащий (а) шарнирную область CD28, необязательный цитокин или необязательный суицидальный ген. Такой набор может содержать или нет один или более реагентов для работы с клетками. Такие реагенты включают, например, малые молекулы, белки, нуклеиновые кислоты, антитела, буферы, праймеры, нуклеотиды, соли и/или их комбинации. В набор могут быть включены нуклеотиды, кодирующие один или более CAR, продукты суицидального гена и/или цитокины. В набор могут быть включены белки, такие как цитокины или антитела, включая моноклональные антитела. Нуклеотиды, кодирующие компоненты сконструированных рецепторов CAR, могут быть включены в набор, включая реагенты для их получения.

ПРИМЕРЫ

[438] Следующие примеры включены для демонстрации определенных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методики, описанные в следующих примерах, представляют собой методики, которые, как обнаружил автор изобретения, хорошо работают при практической реализации данного изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как составляющие определенные варианты для его практической реализации. Однако

специалистам в данной области техники в свете настоящего описания должно быть понятно, что в конкретных описанных вариантах осуществления можно сделать множество изменений и где получить такой же или схожий результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

Пример 1: Создание и связывание моноклональных антител к ВСМА.

[439] В настоящем примере продемонстрированы характеристики антител к ВСМА. Мышей (мышь линии Trianni, несущие трансгенный локус тяжелой цепи и локус каппа человека, возрастом 8-10 недель) иммунизировали в соответствии со способами, описанными в литературе. Для первичной иммунизации животным в лапу вводили 5 мкг рекомбинантного ВСМА-мышиный Fc в виде эмульсии с равными объемами GerbUMM. Мышей иммунизировали таким же образом каждые 3-4 дня, всего 10 бустерных иммунизаций. Животным с высокими титрами антиген-специфических антител за четыре дня до вырезания селезенки и лимфатических узлов для последующей обработки с целью выделения РНК или слияния гибридом проводили предварительное бустерное введение того же иммуногена.

[440] Селезенки мышей выделяли и переносили в 50 мл пробирку, содержащую 10 мл RPMI, 10% ФБС (профильтрованной через 0,2 мкм фильтр) и физически диссоциировали для выделения лимфоцитов. Лимфоциты собирали центрифугированием при 1200 об/мин в течение 10 минут. Лимфоциты суспендировали в буфере EasySep (2 мл; профильтрованный через 0,2 мкм фильтр).

[441] Анти-ВСМА scFv идентифицировали путем создания и отбора библиотеки фагового дисплея иммунизированных scFv. Сначала очищали общую РНК из суспензии одиночных спленоцитов одной отдельной мыши, предварительно иммунизированной ВСМА-экспрессирующими клетками СНО. Затем из этой мыши создавали библиотеку scFv с помощью случайного примирования кДНК с использованием общей РНК в качестве матрицы для амплификации переменных областей из генов мышинных антител. Ампликоны тяжелой цепи и каппа-цепи объединяли и клонировали в фагмидные векторы. Для идентификации ВСМА-специфических фаговых клонов scFv проводили три раунда отбора против рекомбинантных белков ВСМА (человеческий ВСМА-Fc, человеческий ВСМА-6His) и/или клеток, экспрессирующих ВСМА яванского макака. Затем проводили скрининг периплазматических экстрактов отобранных клонов scFv методом ELISA или проточной цитометрии. Отбирали клоны для секвенирования и подтверждали связывание методом Octet с использованием периплазматического экстракта. Всего в результате фагового анализа было идентифицировано 19 клонов. Помимо 19 клонов в отборе антител использовали другие недавно идентифицированные 42 клон антител к ВСМА. В таблице 2 приведены значения аффинности связывания scFv к ВСМА человека с ВСМА человека.

Анализ Octet

[442] Для оценки кинетики связывания с ВСМА проводили анализ связывания Octet.

[443] Анализ связывания Octet проводили, используя белок ВСМА человека с

панелью клонов антител к ВСМА для получения характеристик связывания. Сначала проводили захват ВСМА человека на сенсорных чипах Octet с соответствующим покрытием, затем помещали в лунки, содержащие клоны антител к ВСМА, для ассоциации. После того как сенсорный чип помещали в лунки для диссоциации, рассчитывали реакцию взаимодействия для каждого клона антитела к ВСМА и соответствующего белка ВСМА человека.

Анализ FACS

[444] Клоны антител к ВСМА исследовали в отношении связывания на клетках методом FACS, используя сверхэкспрессирующие ВСМА клетки CHO. Клетки инкубировали с клонами антител к ВСМА, а после этого - со вторичным антителом, способным связываться с клонами антител к ВСМА. Эти образцы должным образом промывали и оценивали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher Scientific). Анализ FACS проводили в FlowJo.

[445] В таблице 3 приведены результаты анализов Octet и FACS типовых клонов антител к ВСМА на типовых антителах к ВСМА и ВСМА человека. Согласно наблюдениями типовой Fab (IgG) имел высокие скорости k_{on} и низкие скорости k_{off} со значениями K_D в низком пикомолярном диапазоне.

Таблица 3: Анализ Octet scFv, созданного методом фагового дисплея из периплазматического экстракта

PE ELISA Bio-huBCM A-His	PE Elisa Bio-суBCM A-His	% связывания по FACS PE с huBCMA	PE Octet K_{off}	Последовательности VH HCDR подчеркнуты	Последовательности VL LCDR подчеркнуты
1,104	0,147	89,01	3,69E-04	QITLRESGGDVVQ PGRSLRLSCAASG FTFSSYAIHWVRQ APGKGLEWVAVT WHDGSKNYAES VMGRFTISRDNK NTLYLHMNSLRAE DTGVYYCARAKE GEPOYFOHWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 26)	DIVMTQSPSFLSASVG DRVITTCRASOGISSY LAWYQQKPGKAPKLL IYAASTLOS GVPSRFS GSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCOOLNSYP WTFGQGTKVDIK (SEQ ID NO: 23)
1,112	0,122	54,65	4,40E-04	QITLRESGGDVVQ PGRSLRLSCAASG FTFSSYAIHWVRQ APGKGLEWVAVT WHDGSKNYAES VMGRFTISRDNK NTLYLHMNSLRAE DTGVYYCARAKE GEPOYFOHWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 26)	DIVMTQSPSFLSASVG DRVITTCRASOGINNY LAWYQQKPGIAPKLLI YAASTLOS GVPSRFGG GSGSGTEFTLTISLQPE DFATYYCOOLKSYPE TFGPGTKVEIK (SEQ ID NO: 25)
0,516	0,126	47,16	4,39E-04	EVQLVESGGDVV QPGRSLRLSCAAS GFTFSSYAIHWVR QAPGKGLEWVAV TWHDGSKNYAE SVMGRFTISRDNK KNTLYLHMNSLR AEDTGVYYCARA KFGPEPOYFOHWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10)	DIVMTQSPSFLSASVG DRVITTCRASOGISSY LAWYQQKPGKAPKLL IYAASTLOS GVPSRFS GSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCOOLNSYP FTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 27)

Таблица 4: Анализы Octet и FACS 2-х лидирующих клонов антитела к ВСМА

Образец	hBCMA-mIgG2a				hBCMA – антиген HIS				hBCMA CHO
	Ответ	K _D (M)	K _{on} (1/ Mc)	K _{dis} (1/c)	Ответ	K _D (M)	K _{on} (1/ Mc)	K _{dis} (1/c)	EC50 мкг/мл
VH: SEQ ID NO: 26, VL: SEQ ID NO: 25 Антитело 2	0,62	1,17E-11	3,79E+05	4,44E-06	1,296	7,88E-11	4,79E+05	3,77E-05	0,144
VH: SEQ ID NO: 10, VL: SEQ ID NO: 27 Антитело 3	0,5813	<1,0E-12	3,08E+05	<1,0E-07	1,3007	6,08E-11	2,19E+05	1,33E-05	0,1167

Пример 2: Конструкции химерных антигенных рецепторов

[446] В этом примере показаны типовые конструкции CAR для снижения опухолевой нагрузки. На Фиг. 1 показаны конструкции CAR, содержащие ВСМА-связывающую область.

[447] ВСМА CAR содержит специфическую связывающую ВСМА молекулу, шарнирную область IgG1 или шарнирную область CD28, трансмембранный домен CD28 и цитокин IL-15 (например, растворимый IL-15). Такой CAR может содержать аминокислоты SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 49.

Пример 3: In vitro эффективность конструкций ВСМА CAR с шарнирной областью IgG и шарнирной областью CD28

[448] В этом примере показана эффективность ВСМА CAR, содержащего шарнирный домен CD28 в виде SEQ ID NO: 45 по сравнению с шарнирным доменом IgG, в СВ-NK-клетках.

[449] Цитотоксичность СВ-NK-клеток оценивали в стандартном четырехчасовом анализе высвобождения хрома-51 (51Cr). Вкратце, клетки-мишени загружали 51Cr, промывали и совместно культивировали с СВ-NK-клетками, трансдуцированными разными конструкциями CAR, содержащими разные ВСМА-специфические связывающие молекулы scFv, в течение 4 часов, после чего супернатант удаляли и измеряли уровень 51Cr, используя гамма-счетчик.

[450] ВСМА-связывающие молекулы исследовали в остове CAR, который содержал шарнирную область IgG1 или шарнирную область CD28. Затем эти CAR трансдуцировали в СВ-NK, и исследовали эффективность in vitro уничтожения в анализе

уничтожения с высвобождением хрома.

[451] Все конструкции продемонстрировали более высокий уровень уничтожения по сравнению с нетрансдуцированными СВ-НК, где несколько большее уничтожения продемонстрировали конструкции, содержащие шарнирную область CD28, в частности, при меньших соотношениях Э:М, как показано на **Фиг. 2**.

Пример 4: Сравнение шарнирного домена CD28 и шарнирного домена IgG1 в отношении снижения опухолевой нагрузки in vivo.

[452] В этом примере проиллюстрировано преимущество использования конструкций ВСМА-CAR с шарнирной областью CD28 для снижения опухолевой нагрузки у мышей.

[453] Для этого эксперимента использовали 10 миллионов ВСМА CAR-НК-клеток (~ 70% CAR+ve), содержащих ВСМАIg1, ВСМАIg2, ВСМА28-1 или ВСМА28-2. 10-12-недельных самок мышей NSG подвергали облучению всего тела при дозе 150 сГр за 24 часа до инокуляции опухолей. Клетки MM.1S-fluc-MDA готовили в суспензии ФСБ в концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл для внутривенной инокуляции клеток при $0,5 \times 10^6$ /животное. Биолюминесцентные изображения делали за 1 день до введения дозы, через 6 дней после инокуляции опухолей и рандомизировали животных на основании общего потока в группы по 4 или 5 животных на группу. Животным вводили дозу через 0, 1 или 9 дней после инокуляции опухолей. CAR НК-клетки в соответствующих концентрациях ресуспендировали в ФСБ и небольшими партиями переносили в виварий на льду, чтобы обеспечить своевременную инфузию животным и где сохранить жизнеспособность CAR НК-клеток. Ежедневно на приборе Xenogen IVIS получали биолюминесцентные изображения для мониторинга прогрессирования опухолей. Массу тела измеряли три раза в неделю, наряду с клиническими наблюдениями для мониторинга любых признаков токсичности. Раз в неделю проводили микрозабор (путем подчелюстного забора крови) для анализа клеточной кинетики с целью количественной оценки экспансии CAR НК in vivo методом дцПЦР или проточного цитометрического анализа. Из гуманных соображений или в момент, соответствующий конечной точке исследования, проводили вскрытие животных из представляющих интерес исследований, чтобы получить различные ткани для патологической оценки.

[454] Для проведения кПЦР СК выделяли геномную ДНК (гДНК) из образцов цельной крови мышей (50 мкл) и очищали с помощью набора MagMAX™ DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit в присутствии РНКазы А. Очищенную гДНК затем анализировали методом дуплексного анализа на основе оптимизированной цифровой капельной ПЦР (цкПЦР), предназначенного для одновременного определения числа копий конструкции CAR и референтного гена α -актина 1 (ACTA1) (однокопийного гена в геноме как человека, так и мыши). Прогрессирование опухолей отслеживали и визуализировали с интервалами в 7 дней. **На Фиг. 3** представлен рост опухолей у мышей после обработки полученными из пуповинной крови НК-клетками, трансдуцированными ВСМА-CAR с шарнирным доменом IgG по сравнению с ВСМА CAR с шарнирным доменом CD28,

относительно роста у необработанных мышей (только опухоли) и мышей, обработанных нетрансдуцированными НК-клетками (NT NK).

[455] Согласно наблюдениям, мыши, получавшие ВСМА-CD28, имели меньшую опухолевую нагрузку по сравнению с только опухолями или NT NK. Мыши, получавшие ВСМА CD28, демонстрировали лучший контроль опухолей по сравнению с ВСМА IgG в течение первых 2 недель, прежде чем погибали по причине, не связанной с опухолевой нагрузкой. Легкие, печень и селезенку исследовали в отношении инфильтрации лимфоцитов. **На Фиг. 8** показан типовой гистопатологический слайд со сравнением легкого нормальной мыши и легкого мыши, обработанной ВСМА28-2 CAR-NK-клетками. Все ткани фиксировали в 10% забуференном формалине путем погружения, а также трахеальной инстилляцией легких. После полной фиксации (24-48 ч) органы обрезали и обрабатывали для погружения в парафин. Парафиновые блоки секционировали на 4-6 мкм, участки ткани наносили на предметные стекла, окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и накрывали покровным стеклом.

[456] Флуктуации массы тела обобщены на **Фиг. 12**.

[457] Патологическую оценку проводил сертифицированный (ECVP) ветеринарный патологоанатом. Неопластические поражения оценивали в соответствии с их наличием в исследуемых органах. Ненеопластические поражения оценивали на основании их тяжести и распространенности. Результаты гистопатологических исследований фиксировали в системе программного обеспечения Pristima®.

[458] В легких, печени и селезенке наблюдалась инфильтрация лимфоцитов, которая, как полагают, является причиной смерти, не связанной с опухолевой нагрузкой, как видно на **Фиг. 8**. Однако снижение дозы до 1 миллиона и 3 миллионов НК-клеток в целом значительно снижало смертность, не связанную с опухолевой нагрузкой, и повышало выживаемость, как видно на **Фиг. 4**.

***Пример 5:** Сравнение противоопухолевой активности совместно вводимых ВСМА-CAR у мышей с опухолями MM1s*

[459] В этом примере приведено сравнение противоопухолевой активности типовых совместно вводимых ВСМА-CAR НК-клеток.

[460] 1 миллион ВСМА CAR-NK-клеток (~ 70% CAR+ve), содержащих SEQ ID NO: 19 или 20, вводили мышам совместно с опухолями MM1s. Прогрессирование опухолей отслеживали и визуализировали с интервалами в 6-7 дней. **На Фиг. 5** приведено иллюстративное изображение выживаемости мышей, обработанных 1 М ВСМА-NK-клетками, содержащими ВСМА28-1 или ВСМА28-2. Согласно наблюдениям, мыши, которым вводили ВСМА-CAR с ВСМА28-2, демонстрировали наилучшие результаты с 50% выживших мышей в день 77 относительно связанной с опухолями гибелью, по сравнению с мышами, которым совместно вводили CAR-NK-клетки, содержащие ВСМА28-1.

***Пример 6:** Схема с отсроченным введением ВСМА-CAR-NK и ВСМА-CAR-T*

[461] В этом примере продемонстрировано, что ВСМА28-1 работал лучше по

сравнению с другими исследуемыми ВСМА-CAR, где все конструкции CAR обеспечивают эффективную противоопухолевую активность.

Получение CAR-T-клеток:

[462] Для получения CAR-T были приобретены продукты человеческого лейкофереза (лейкопаки) от компании Stem cell Technologies. МКПК выделяли из свежих лейкопаков с помощью градиента плотности фиколла. Набор для выделения человеческих Т-клеток EasySep от Stemcell technologies использовали для очистки Т-клеток, которые затем активировали/размножали, используя гранулы T Cell TransAct и IL-2 исследовательского класса от Miltenyi Biotec. В день 2 активации Т-клеток клетки трансдуцировали вирусом VSVG путем спинокуляции, затем использовали в день 7 для проведения *in vitro* анализов.

Получение CAR-NK-клеток:

[463] Для получения CAR-NK была получена пуповинная кровь (ПК) для исследований из Банка пуповинной крови онкологического центра MD Anderson. Мононуклеарные клетки ПК выделяли из замороженных блоков ПК посредством центрифугирования в градиенте плотности фиколла. *Ex vivo* размножение NK-клеток, полученных из пуповинной крови (CB-NK-клетки), проводили с помощью стимуляции *α*APC в день 0 в дополнение к добавлению IL-2 каждые 2 дня. В день 6 клетки трансдуцировали вирусом RD114, используя спинокуляцию. Клетки стимулировали путем второго раунда добавления *α*APC в день 8 и 9 и каждые 2 дня добавляли IL-2, пока их не использовали для *in vivo* или *in vitro* исследований в день 15.

[464] 1 миллион или 3 миллиона CAR-NK-клеток ВСМА (~ 70% CAR+ve), содержащих ВСМА28-2, в/в вводили мышам через день после инокуляции опухолевых клеток MM1s («отсроченное на 1 день введение»).

[465] Прогрессирование опухолей отслеживали и визуализировали с интервалами в 7 дней. **На Фиг. 6** представлен рост опухолей у мышей, обработанных нетрансдуцированными NK-клетками или NK-клетками, трансдуцированными ВСМА-CAR с шарнирным доменом CD28, как функция количества дней в схеме с отсроченным на 1 день введением дозы. **На Фиг. 7** приведена кривая выживаемости Каплана - Майера при отсроченном на 1 день введении дозы для NK-клеток, экспрессирующих ВСМА28-2. Аналогичные эксперименты повторяли с отсроченным на 9 дней введением дозы с NK-клетками, экспрессирующими ВСМА28-2 CAR. Согласно наблюдениям, ВСМА28-2 CAR-NK-клетки обеспечивали продленную выживаемость по сравнению с только опухолью или нетрансдуцированными NK-клетками.

[466] Согласно наблюдениям, переход от совместного введения до условий отсроченной дозы (отсроченной на 1 и 9 дней дозы) продолжал демонстрировать положительное противоопухолевое влияние обработки ВСМА CAR-NK.

Пример 7: Секреция IL-15 в ВСМА-CAR-NK-клетках

[467] В этом примере продемонстрировано, что типовые, трансдуцированные конструкцией ВСМА-CAR - IL-15 NK-клетки сохраняются *in vivo* согласно данным

измерения числа копий CAR на 1000 клеток и секреции IL-15.

[468] Биоанализ человеческого IL-15 в образцах плазмы мышей NSG проводили, используя электрохемилюминесцентный иммуноанализ на платформе Meso Scale Discovery (MSD®) и набор для анализа человеческого IL-15 U-PLEX (номер по каталогу K151URK/(BRS 20-735), поставщик MSD). В анализах U-PLEX® биотинилированные захватывающие антитела сначала связывают со стрептавидином на поверхности планшета U-PLEX®. В планшет добавляют калибраторы, контроли и образцы и инкубируют со встряхиванием при комнатной температуре. Затем в калибраторах, контролях и образцах проводят связывание человеческого IL-15 с захватывающими антителами. После промывки в планшет добавляли раствор, содержащий антитела для выявления, конъюгированные с электрохемилюминесцентными метками (MSD GOLD SULFO-TAG), с последующим еще одним периодом инкубации. После инкубации с антителом для выявления планшет промывали и добавляли в лунки 2X буфер для считывания. Сразу проводили считывание планшета на MSD Sector Imager S600. Наблюдали эффективное дозозависимое размножение ВСМА CAR-NK-клеток, экспрессирующих ВСМА-CAR с SEQ ID NO: 20, и повышение выработки IL-15 в условиях с отсроченной дозой, как видно на **Фиг. 9**.

ПРИМЕР 8: ПРИМЕНЕНИЕ КОНСТРУКЦИЙ ВСМА CAR ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ УНИЧТОЖЕНИЯ СРЕДИ ПРОЧИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В Т-клеточных условиях

[469] В этом примере продемонстрировано применение конструкций ВСМА CAR (например, ВСМАIg1, ВСМАIg2, ВСМА28-1, ВСМА28-2) в активности уничтожения опухолевых клеток.

[470] Цитотоксичность в Т-клеточных условиях оценивали, используя люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glow от Promega в соответствии с протоколом производителя. Для анализа апоптоза и митохондриального повреждения клетки-мишени MM.1S-ffluc-MDA метили красным красителем CellTracker Deep Red от Invitrogen и использовали набор MultiCyt Apoptosis Kit от Sartorius для измерения позитивности каспаз и митохондриального повреждения в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, активацию каспазы 3 и 7 выявляют с помощью субстрата NucView 488 Caspase-3/7, который флуоресцирует после расщепления. Мембранный потенциал митохондрий определяли путем секвестрации флуоресцентной малой молекулы в просвете интактных митохондрий с активным мембранным потенциалом, которая после деполяризации митохондрий просачивается в цитоплазму клетки, демонстрируя снижение флуоресценции. Для получения результатов проточной цитометрии использовали проточный цитометр iQue от Intellicyte.

[471] Конструкции ВСМА CAR (например, ВСМАIg1, ВСМАIg2, ВСМА28-1, ВСМА28-2) исследовали в таком же остове CAR в человеческих первичных Т-клетках против ВСМА-позитивной линии клеток MM.1S-ffluc-MDA.

[472] Все конструкции ВСМА CAR демонстрировали уничтожение, превышающее таковое для CD19 CAR-экспрессирующих Т-клеток (отрицательный контроль). Кроме

того, конструкции с использованием шарнирной области CD28 демонстрировали повышенный уровень цитотоксичности, апоптоза и митохондриального повреждения по сравнению с такой же связывающей молекулой в остове CAR, содержащей шарнирную область IgG1. Специфическое уничтожение опухолевых клеток на основании результатов 3 разных анализов проиллюстрировано на **Фиг. 10 (А-С)**.

Пример 9: Анализ апоптоза в трансфицированных CAR-NK-клетках

[473] Этот эксперимент был разработан для анализа апоптоза в CAR-NK, трансдуцированных BCMA28-1 или BCMA28-2, в присутствии или отсутствие растворимого BCMA.

[474] Для анализа апоптоза клетки-мишени MM.1S-ffluc-MDA метили красным красителем CellTracker Deep Red от Invitrogen и использовали набор MultiCyt Apoptosis Kit от Sartorius для измерения позитивности каспаз в соответствии с протоколом производителя. Эффекторные клетки совместно культивировали с клетками-мишенями в присутствии или отсутствие 800 нг/мл растворимого рекомбинантного BCMA, полученного от ACRO Biosciences. Вкратце, активацию каспазы 3 и 7 выявляют с помощью субстрата NucView 488 Caspase-3/7, который флуоресцирует после расщепления. Для получения результатов проточной цитометрии использовали проточный цитометр iQue от Intellicyte.

[475] Согласно наблюдениям, CAR-NK индуцировали более низкие уровни апоптоза в клетках-мишенях в присутствии 800 нг/мл растворимого BCMA, в частности при высоких соотношениях Э:М, как видно на **Фиг. 11**.

Пример 10: In vivo эффективность конструкций BCMA CAR против опухоли MM1S

[476] В этом примере проиллюстрирована эффективность BCMA28-2-содержащего CAR, экспрессируемого в СВ-NK-клетках, против опухоли MM1S.

[477] 10-12-недельных самок мышей NSG подвергали облучению всего тела при дозе 150 сГр за 24 часа до инокуляции опухолей. MM. Клетки 1S-ffluc-MDA готовили в суспензии ФСБ в концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл для внутривенной инокуляции клеток при $0,5 \times 10^6$ /животное. Биoluminesцентные изображения делали за 1 день до введения дозы, через 6 дней после инокуляции опухолей и рандомизировали животных на основании общего потока в группы по 4 животных на группу. Животным вводили дозу через 7 дней после инокуляции опухолей. CAR-экспрессирующие NK (т. е. CAR NK)-клетки, которые были криозаконсервированы в криосоставе (например, 38,6% PLASMA-LYTE A+50% CS10 +10% ЧСА+0,8% АК+ витамин+30 мМ трегалозы), размораживали и непосредственно вводили мышам с буфером ФСБ без промывки. Ежедневно на приборе Xenogen IVIS получали биoluminesцентные изображения для мониторинга прогрессирования опухолей. Массу тела измеряли три раза в неделю, наряду с клиническими наблюдениями для мониторинга любых признаков токсичности. Раз в неделю проводили микрозабор (путем подчелюстного забора крови) для анализа клеточной кинетики с целью количественной оценки экспансии CAR NK in vivo методом

дцПЦР или проточного цитометрического анализа. Из гуманных соображений или в момент, соответствующий конечной точке исследования, проводили вскрытие животных из представляющих интерес исследований, чтобы получить различные ткани для токсической/патологической оценки.

[478] Все трансдуцированные CAR NK-клетки демонстрировали преимущество в выживаемости по сравнению с только опухолями (**Фиг. 13**).

Производство CAR-NK-клеток

[479] Для получения CAR-NK была получена пуповинная кровь (ПК) для исследований из Банка пуповинной крови онкологического центра MD Anderson. Мононуклеарные клетки ПК выделяли из замороженных блоков ПК посредством центрифугирования в градиенте плотности фиколла. *Ex vivo* размножение NK-клеток, полученных из пуповинной крови (CB-NK-клетки), проводили с помощью стимуляции uAPC в день 0 в дополнение к добавлению IL-2 каждые 2 дня. В день 6 клетки трансдуцировали вирусом RD114, используя спинокуляцию. Клетки стимулировали путем второго раунда добавления uAPC в день 8 и 9 и каждые 2 дня добавляли IL-2, пока их не использовали для *in vivo* или *in vitro* исследований в день 15 или криоконсервировали в день 21 для использования в будущем.

Пример 11: In vitro эффективность конструкций BCMA CAR против нескольких опухолевых линий

[480] В этом примере проиллюстрирована эффективность BCMA28-2 CAR, экспрессируемого в CB-NK-клетках, против разных опухолевых клеток.

[481] Клетки MM1S-Luc, RPMI-8226-Luc, JLN3-Luc и JLN3-Luc BCMA KO один раз промывали ФСБ, инкубировали с темно-красным красителем для отслеживания клеток (Invitrogen, № C34565) при разведении 1: 10000 в ФСБ при 37 °C в течение 20 минут с плотностью клеток 2,5 миллиона/мл. По окончании инкубации в клетки добавляли 20 мл клеточной культуральной среды и центрифугировали при 500g в течение 5 минут, супернатант удаляли и промывали клетки еще раз, используя соответствующую клеточную культуральную среду. Затем клетки повторно суспендировали в культуральной среде при 0,25 млн/мл и добавляли по 30 мкл клеток в каждую лунку 384-луночных аналитических планшетов с V-образным дном (Greiner, каталог: 781280). Клетки инкубировали при 37 °C в клеточном культуральном инкубаторе с 5% CO₂ в течение 1-2 часов. Свежие эффекторные клетки собирали в день 15 и один раз промывали в не содержащей цитокины среде для NK-клеток (CellGenix GMP SCGM с 10% HI-FBS и 2 mM глутамина), затем в аналитические планшеты добавляли 10 мкл эффекторных клеток при разных соотношениях Э:М. Клетки-мишени и эффекторные клетки совместно культивировали в течение 20 часов, затем клетки центрифугировали и собирали супернатант для анализа высвобождения цитокинов. Клетки инкубировали с 10 мкл реагента каспазы 3/7 (Intelliscyt, каталог: 91035), разведенного 1:500 в соответствующей среде для клеток-мишеней, в течение 1 часа в клеточном культуральном инкубаторе при 37 °C, а затем проводили анализ FACS, используя Sartorius iQue3 или Sartorius iQue

screeener Plus. Процент клеток-мишеней с положительным окрашиванием каспазой 3/7 использовали для оценки цитотоксичности эффекторных клеток.

[482] *In vitro* активность уничтожения была продемонстрирована разными полученными от доноров СВU содержащими конструкцию ВСМА28-2 CAR НК-клетками против нескольких линий опухолевых клеток (как показано на **Фиг. 14А-Д**).

Пример 12. *Способность ВСМА CAR НК-клеток уничтожать опухолевые клетки in vitro с несколькими раундами повторной стимуляции*

[483] В этом примере проиллюстрирована эффективность ВСМА28-2 CAR, экспрессируемого в СВ-НК-клетках.

[484] Эффекторные клетки собирали и ресуспендировали в SCGM (CellGenix, номер по каталогу: 20802-0500), дополненной 10% термоинактивированной ФБС (Sigma, номер по каталогу: F4135-500 мл), 1% L-глутамином (Gibco, номер по каталогу: 25030-081), 1% пенициллином-стрептомицином (Gibco, номер по каталогу: 15140-122) и 100 МЕ/мл человеческого IL-2 (Miltenyi, номер по каталогу: 130-097-748). Эффекторные клетки высевали в трех повторах в 48-луночный не обработанный для тканевого культивирования планшет с плоским дном (Corning, номер по каталогу: 3548) при плотности 2×10^5 клеток/лунка (модель MM1S). Клетки-мишени, которые перед этим были трансдуцированы лентивирусом NucLight Red (Sartorius, номер по каталогу: 4476) и подвергнуты селекции с 1 мкг/мл пурамицина (Sigma, номер по каталогу: P8833-10MG), собирали и ресуспендировали в полной среде, описанной выше, и высевали при плотности 5×10^4 клеток/лунка. Планшеты помещали в IncuCyte S3 (Sartorius Inc.) и измеряли по четыре считывания на лунку в ярком поле и красном канале, используя 10X объектив, каждые 30 минут. Клетки-мишени готовили, как описано выше, и пересеивали при плотности 5×10^4 клеток/лунка каждые 48-72 часа (модель MM1S), в целом для 9 опухолевых стимуляций/повторных стимуляций. Цитолиз клеток-мишеней представлен как среднее количество красных объектов на изображение (**Фиг. 15А**) и общая средняя площадь под кривой количества красных объектов (**Фиг. 15В**).

Пример 13: *In vivo* эффективность конструкций ВСМА CAR против опухоли RPMI-8226

[485] 10-12-недельных самок мышей NSG подвергали облучению всего тела при дозе 150 сГр за 24 часа до инокуляции опухолей. Клетки RPMI-8226-luc готовили в суспензии ФБС в концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл для внутривенной инокуляции клеток при $0,5 \times 10^6$ /животное. Биолюминесцентные изображения делали за 1 день до введения дозы, через 6 дней после инокуляции опухолей и рандомизировали животных на основании общего потока в группы по 4 животных на группу. Животным вводили дозу через 7 дней после инокуляции опухолей. CAR-экспрессирующие НК-клетки в соответствующих концентрациях ресуспендировали в ФБС и небольшими партиями переносили в виварий на льду, чтобы обеспечить своевременную инфузию животным и где сохранить жизнеспособность CAR-экспрессирующих НК-клеток. Ежедневно на приборе Xenogen IVIS получали биолюминесцентные изображения для мониторинга

прогрессирования опухолей. Массу тела измеряли три раза в неделю, наряду с клиническими наблюдениями для мониторинга любых признаков токсичности. Раз в неделю проводили микрозабор (путем подчелюстного забора крови) для анализа клеточной кинетики с целью количественной оценки экспансии CAR NK in vivo методом дцПЦР или проточного цитометрического анализа.

[486] Группы, обработанные ВСМА28-2 (с костимулирующим доменом CD28)-CAR NK, демонстрировали противоопухолевую активность по сравнению с UTD NK (Фиг. 16).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против антигена созревания В-клеток (BCMA) или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), где

HCDR1 содержит SYAIH (SEQ ID NO: 2),

HCDR2 содержит VTWHDGSKYKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3) и

HCDR3 содержит AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4).

2. Антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело против BCMA или его фрагмент связывается с BCMA с K_D более чем 0 и менее чем 150 нМ.

3. Антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, где антитело против BCMA или его фрагмент связывается с BCMA с K_D более чем 1 пМ и менее чем 10 нМ.

4. Антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где антитело против BCMA или его фрагмент связывается с BCMA, презентруемым на клетках человека, с EC50 от 0,05 до 0,5 мкг/мл.

5. Антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где антитело против BCMA или его фрагмент содержит три вариабельные области легкой цепи (LCDR),

где LCDR2 содержит AASTLQS (SEQ ID NO: 7).

6. Антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где антитело против BCMA или его фрагмент содержит три вариабельные области легкой цепи (LCDR), где

LCDR1 содержит RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11),

LCDR2 содержит AASTLQS (SEQ ID NO: 7) и

LCDR3 содержит QQLNSYPWT (SEQ ID NO: 14).

7. Антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, где антитело против BCMA или его фрагмент содержит три вариабельные области легкой цепи (LCDR), где

LCDR1 содержит RASQGINNYLA (SEQ ID NO: 6),

LCDR2 содержит AASTLQS (SEQ ID NO: 7) и

LCDR3 содержит QQLKSYPT (SEQ ID NO: 8).

8. Антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, где антитело против BCMA или его фрагмент содержит три вариабельные области легкой цепи (LCDR), где

LCDR1 содержит RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 11),

LCDR2 содержит AASTLQS (SEQ ID NO: 7) и

LCDR3 содержит QQLNSYPPT (SEQ ID NO: 12).

9. Антитело против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из

предшествующих пунктов, где антитело против ВСМА или его фрагмент представляет собой антитело, содержащее константную область IgG.

10. Антитело против антигена созревания В-клеток (ВСМА) или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие три LCDR, где

LCDR1 содержит RASQGIX₁X₂YLA (SEQ ID NO: 79),

LCDR2 содержит AASTLQS (SEQ ID NO: 7) и/или

LCDR3 содержит QQLX₃SYPX₄T (SEQ ID NO: 80);

где X₁ выбран из S или N;

X₂ выбран из S или N;

X₃ выбран из N или K; и/или

X₄ выбран из F или W.

11. Антитело против ВСМА по любому из предшествующих пунктов, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 9.

12. Антитело против ВСМА по любому из предшествующих пунктов, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность VH, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 9.

13. Антитело против ВСМА по любому из предшествующих пунктов, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 1.

14. Антитело против ВСМА по любому из предшествующих пунктов, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность VH, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1.

15. Антитело против ВСМА по любому из предшествующих пунктов, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 5, 10 или 13.

16. Антитело против ВСМА по любому из предшествующих пунктов, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность VL, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5, 10 или 13.

17. Антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где антитело против ВСМА или фрагмент выбрано из группы, состоящей из антитела IgA, антитела IgG, антитела IgE, антитела IgM, би- или мультиспецифического антитела, фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fd', фрагмента Fd, выделенных CDR или их наборов; одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), слияния полипептид-Fc, однодоменного антитела, антитела верблюжьих; маскированного антитела, малых модульных иммунофармацевтических средств («SMIPs™»), одиночной цепи, tandemного диатела, VHH, антикалина, нанотела, минител, BiTE, белка анкиринового повтора, DARPIN, авимера, DART, TCR-подобного антитела, аднектина, аффилина, транстела; аффитела, TrimerX, MicroProtein, финомера, центрина; и KALBITOR.

18. Антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, где антитело против ВСМА или его фрагмент представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

19. Антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 18, где ВСМА-связывающий scFv содержит линкерную последовательность.

20. Антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 19, где ВСМА-связывающий scFv содержит линкер, выбранный из SEQ ID NO: 15-18.

21. Антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 18, где ВСМА-связывающий scFv содержит сигнальный пептид.

22. Антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 18, где ВСМА-связывающий scFv содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85-87.

23. Антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 22, где ВСМА-связывающий scFv содержит последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 85, 86 или 87.

24. Антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за связывание с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащими:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), где

HCDR1 содержит SYAIH (SEQ ID NO: 2),

HCDR2 содержит VTWHDGSNKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3) и

HCDR3 содержит AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4).

25. Антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, которые конкурируют за связывание с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащими три LCDR, где

LCDR1 содержит RASQGIX₁X₂YLA (SEQ ID NO: 79),

LCDR2 содержит AASTLQS (SEQ ID NO: 7) и/или

LCDR3 содержит QQLX₃SYPX₄T (SEQ ID NO: 80);

где X₁ выбран из S или N;

X₂ выбран из S или N;

X₃ выбран из N или K; и/или

X₄ выбран из F или W.

26. Способ лечения рака, включающий введение пациенту антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из предшествующих пунктов.

27. Способ по п. 26, где рак представляет собой злокачественное образование из иммунных клеток, например, лейкоз, лимфому или миелому.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель, где антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), где

HCDR1 содержит SYAIH (SEQ ID NO: 2),

HCDR2 содержит VTWHDGSNKYYAESVMG (SEQ ID NO: 3) и

HCDR3 содержит AKFGEPQYFQH (SEQ ID NO: 4).

29. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель, где антитело против ВСМА или его фрагмент содержат:

определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 2, которая содержит AASTLQS (SEQ ID NO: 7).

30. Полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается с антигеном созревания В-клеток (BCMA), шарнирную область CD28, трансмембранный домен и один или более внутриклеточных сигнальных доменов.

31. Полинуклеотид по п. 30, где антигенсвязывающая молекула, специфически связывающаяся с ВСМА, содержит:

(a) определяющую комплементарность область (CDR) 1 тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 2,

(b) VH CDR2, содержащую SEQ ID NO: 3, и

(c) VH CDR3, содержащую SEQ ID NO: 4.

32. Полинуклеотид по п. 31, где антигенсвязывающая молекула, специфически связывающаяся с ВСМА, содержит:

(a) определяющую комплементарность область (CDR) 1 легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 6,

(b) VL CDR2, содержащую SEQ ID NO: 7, и

(c) VL CDR3, содержащую SEQ ID NO: 8.

33. Полинуклеотид по п. 32, где антигенсвязывающая молекула, специфически связывающаяся с ВСМА, содержит:

(a) определяющую комплементарность область (CDR) 1 легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 11,

(b) VL CDR2, содержащую SEQ ID NO: 7, и

(c) VL CDR3, содержащую SEQ ID NO: 12.

34. Полинуклеотид по п. 31, где антигенсвязывающая молекула, специфически связывающаяся с ВСМА, содержит:

(a) определяющую комплементарность область (CDR) 1 легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 11,

(b) VL CDR2, содержащую SEQ ID NO: 7, и

(c) VL CDR3, содержащую SEQ ID NO: 14.

35. Полинуклеотид по любому из пп. 30-34, где антигенсвязывающая молекула, специфически связывающаяся с ВСМА, содержит аминокислотную последовательность,

по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или 9.

36. Полинуклеотид по любому из пп. 30-35, где антигенсвязывающая молекула, специфически связывающаяся с ВСМА, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 5, 10 или 13.

37. Полинуклеотид по любому из предшествующих пунктов, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из: фрагмента Fab, фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fv или одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv).

38. Полинуклеотид по любому из пп. 30-37, где антигенсвязывающая молекула содержит scFv.

39. Полинуклеотид по любому из пп. 30-38, где VH и VL соединены линкером.

40. Полинуклеотид по п. 39, где линкер содержит от около 50 аминокислот до около 2 аминокислот.

41. Полинуклеотид по п. 39, где линкер содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 15-18.

42. Полинуклеотид по любому из пп. 30-41, где антигенсвязывающая молекула связывается с ВСМА с K_D менее чем около 1×10^{-6} М, менее чем около 1×10^{-7} М, менее чем около 1×10^{-8} М или менее чем около 1×10^{-9} М.

43. Полинуклеотид по любому из пп. 30-42, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28, CD3 ζ , CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D или любую их комбинацию.

44. Полинуклеотид по п. 43, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28.

45. Полинуклеотид по любому из пп. 30-44, где шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 56.

46. Полинуклеотид по любому из пп. 30-45, дополнительно содержащий костимулирующую область.

47. Полинуклеотид по п. 46, где костимулирующая область представляет собой сигнальную область CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белка

запрограммированной гибели 1 (PD-1), индуцибельного костимулятора Т-клеток (ICOS), CD8 гамма, CD3 дельта, CD3 эpsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член 14 суперсемейства факторов некроза опухолей; TNFSF1.4), NKG2C, Ig альфа (CD79a), Fc-гамма-рецептора, молекулы ГКГС класс I, белков рецепторов TNF, иммуноглобулин-подобных белков, рецепторов цитокинов, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, рецептора лиганда Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFRR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD 19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, 11.2 бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, ITGAE, CD103, ITGAL, LFA-1, ITGAM, ITGAX, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD 19a, лиганда, который специфически связывается с CD83, или любую их комбинацию.

48. Полинуклеотид по любому из пп. 30-47, где костимулирующая область содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 28.

49. Полинуклеотид по любому из пп. 30-48, дополнительно содержащий домен активации.

50. Полинуклеотид по п. 49, где домен активации представляет собой домен CD3ζ.

51. Полинуклеотид по п. 49 или п. 50, где домен активации содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 30.

52. Полинуклеотид по любому из пп. 30-51, дополнительно содержащий суицидальный ген.

53. Полинуклеотид по п. 52, где суицидальный ген выбран из ритуксимаба, i-каспазы 9, тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-tk) и ганцикловира, ацикловира или FIAU; оксидоредуктазы и циклогексимида; цитозиндезаминазы и 5-фторцитозина; тимидинкиназы тимидилаткиназы (Tdk::Tmk).

54. Полинуклеотид по любому из пп. 52-53, где суицидальный ген представляет собой i-каспазу 9.

55. Полинуклеотид по любому из пп. 30-54, дополнительно содержащий цитокин.

56. Полинуклеотид по п. 55, где цитокин выбран из IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 или IL-21.

57. Полинуклеотид по любому из пп. 55-56, где цитокин представляет собой IL-15.
58. Полинуклеотид по п. 57, где аминокислотная последовательность IL-15 содержит SEQ ID NO: 23.
59. Полинуклеотид по любому из пп. 30-58, где CAR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 19-21.
60. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 59.
61. Вектор по п. 60, который представляет собой ретровирусный вектор, ДНК-вектор, плазмиду, РНК-вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вектор, лентивирусный вектор или любую их комбинацию.
62. CAR, кодируемый полинуклеотидом по любому из пп. 30-59.
63. Клетка, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 30-59, вектор по любому из пп. 60-61, CAR по п. 62 или любая их комбинация.
64. Клетка по п. 63, где клетка представляет собой иммунную клетку.
65. Клетка по любому из пп. 63-64, где клетка представляет собой NK-клетку, Т-клетку или опухоль-инфильтрирующий лимфоцит (ОИЛ), iNKT-клетки, В-клетки, макрофаги, дендритные клетки или их смесь.
66. Композиция, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 30-59, вектор по любому из пп. 60-61, CAR по п. 62 или клетку по любому из пп. 63-65.
67. Популяция иммунных клеток, содержащая клетку по любому из пп. 63-66.
68. Способ лечения рака у индивида, включающий этап введения индивиду терапевтически эффективного количества композиции по п. 66.
69. Способ по п. 68, дополнительно включающий этап назначения индивиду эффективного количества дополнительной терапии.
70. Способ по п. 68, где дополнительная терапия включает хирургическое вмешательство, лучевую терапию, генную терапию, иммунотерапию или гормональную терапию.
71. Способ по любому из пп. 68-70, где клетки, содержащие полинуклеотид, или клетки, содержащие вектор, вводят индивиду путем инфузии, инъекции, внутривенно, внутриартериально, внутрибрюшинно, интратекально, интратуморально, внутримышечно, эндоскопично, внутриочагово, интракраниально, чрескожно, подкожно, местно, путем перфузии, в опухолевое микроокружение или любой их комбинации.
72. Способ по любому из пп. 68-71, где рак выбран из множественной миеломы, лимфомы и/или лейкоза.
73. NK-клетка, содержащая полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий:
- (а) антигенсвязывающую молекулу, специфически связывающуюся с ВСМА, содержащую
- вариабельную область тяжелой цепи (VH), по меньшей мере на около 95%, по

меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную SEQ ID NO: 1 или 9, и

вариабельную область легкой цепи (VL), по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 5, 10 или 13,

- (b) шарнирную область CD28,
- (c) трансмембранный домен и
- (d) один или более внутриклеточных сигнальных доменов.

74. Полинуклеотид, кодирующий ВСМА-связывающий CAR, содержащий:

- (a) шарнирную область CD28,
- (b) трансмембранный домен,
- (c) костимулирующий домен и
- (d) цитокин IL-15.

75. НК-клетка, содержащая полинуклеотид по п. 74.

76. Иммунная клетка, содержащая полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит:

- (a) антигенсвязывающий домен,
- (b) шарнирную область CD28 и
- (c) трансмембранный домен CD28.

77. Иммунная клетка по п. 76, где клетка содержит CAR, связывающийся с ВСМА, экспрессируемым на опухолевых клетках.

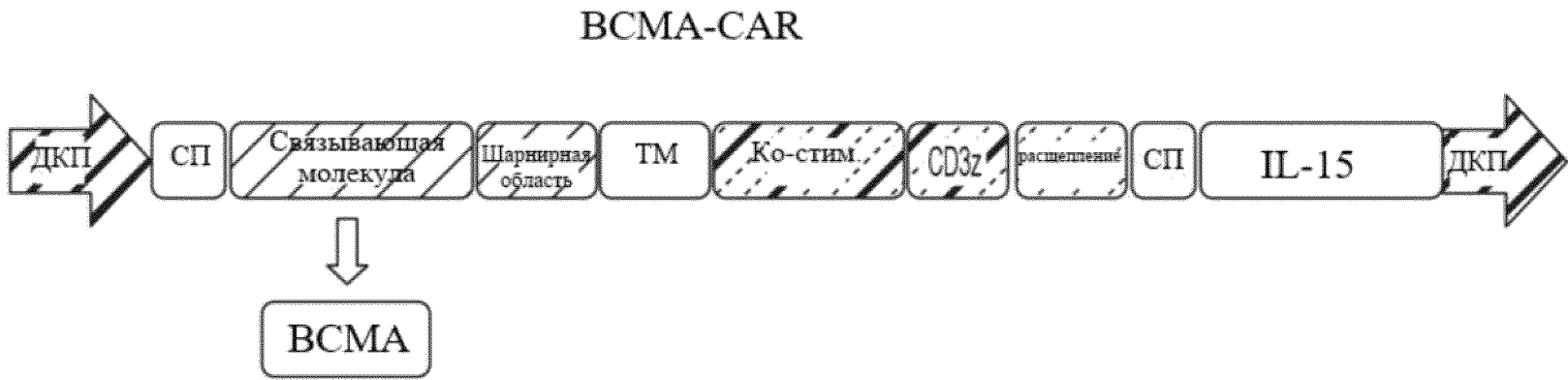
78. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело против ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-25.

79. Полинуклеотид по п. 78, содержащий по меньшей мере одну химическую модификацию.

80. Полинуклеотид по п. 78, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55-56, 58-59, 63, 67, 71 и 76-78.

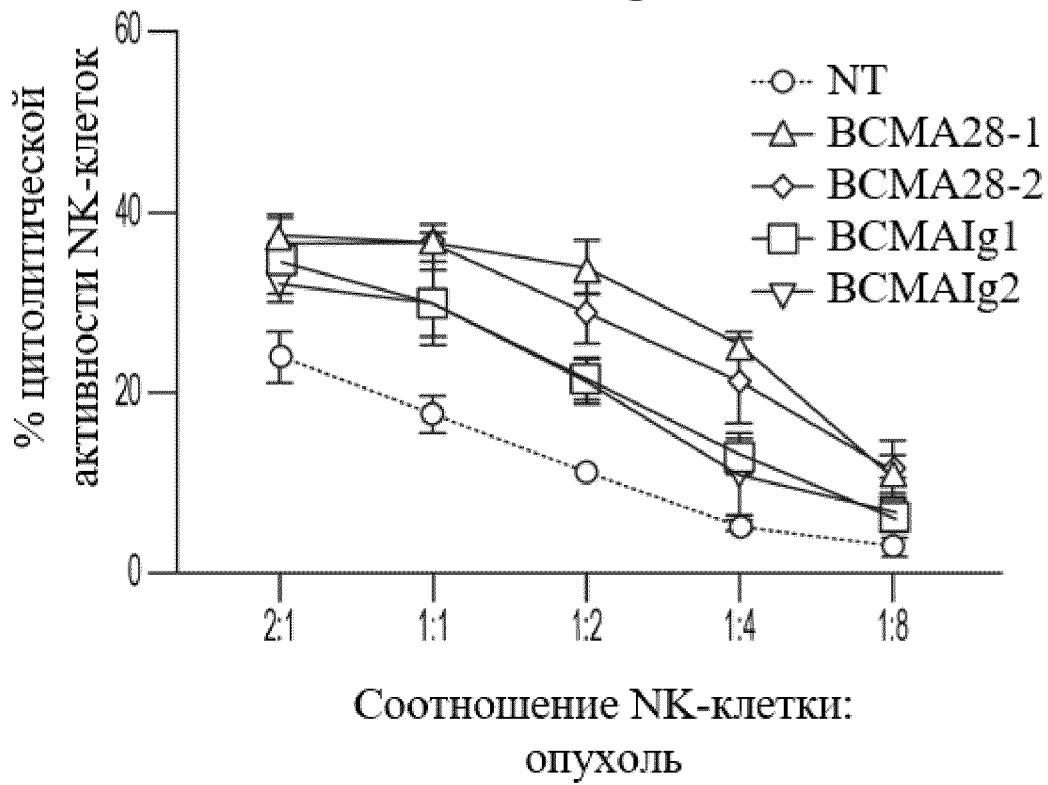
81. НК-клетка, экспрессирующая ВСМА-связывающий CAR по п. 62.

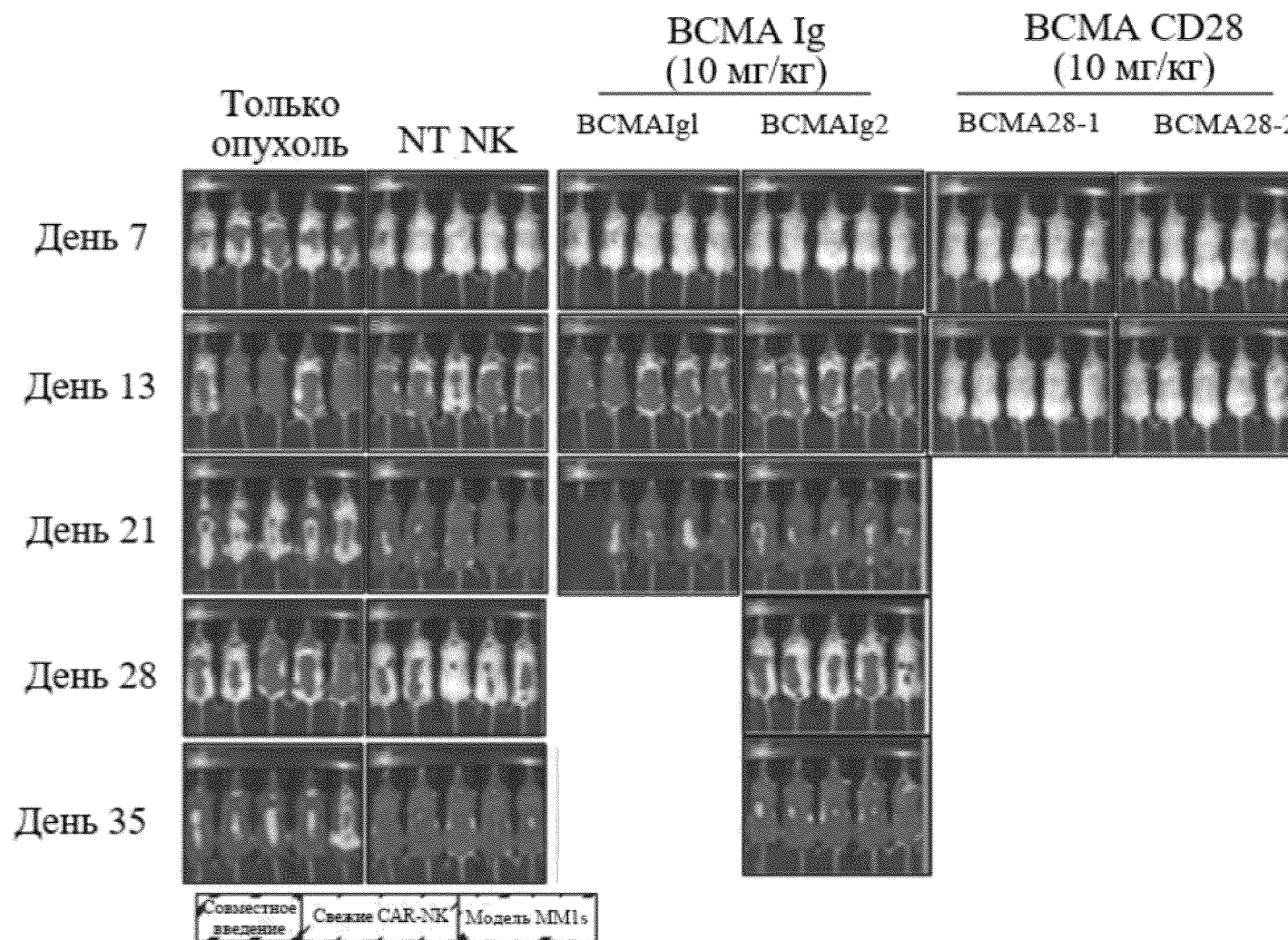
По доверенности



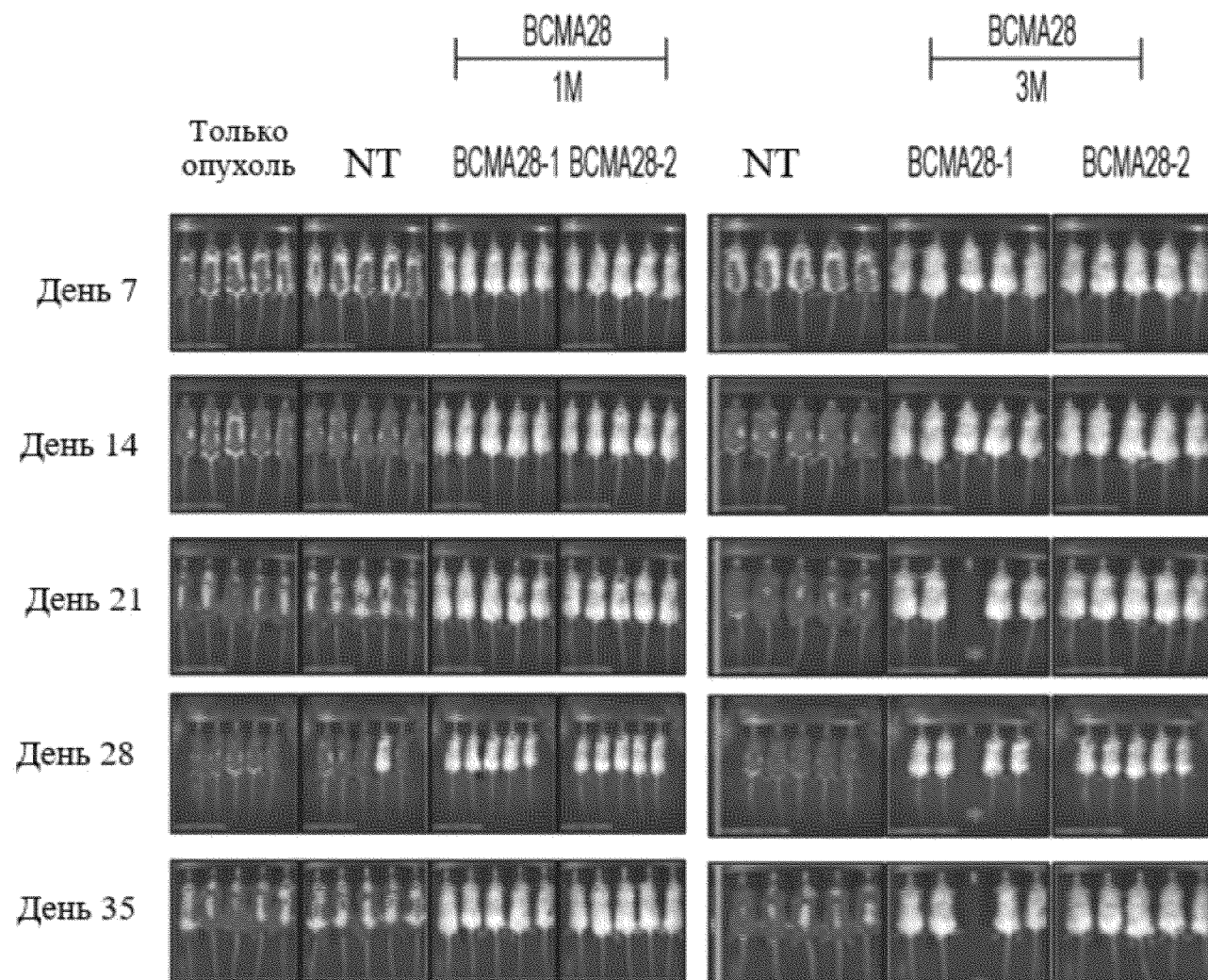
[Фиг. 1]

[Фиг. 2]

BCMA CD28 и шарнирная
область IgG

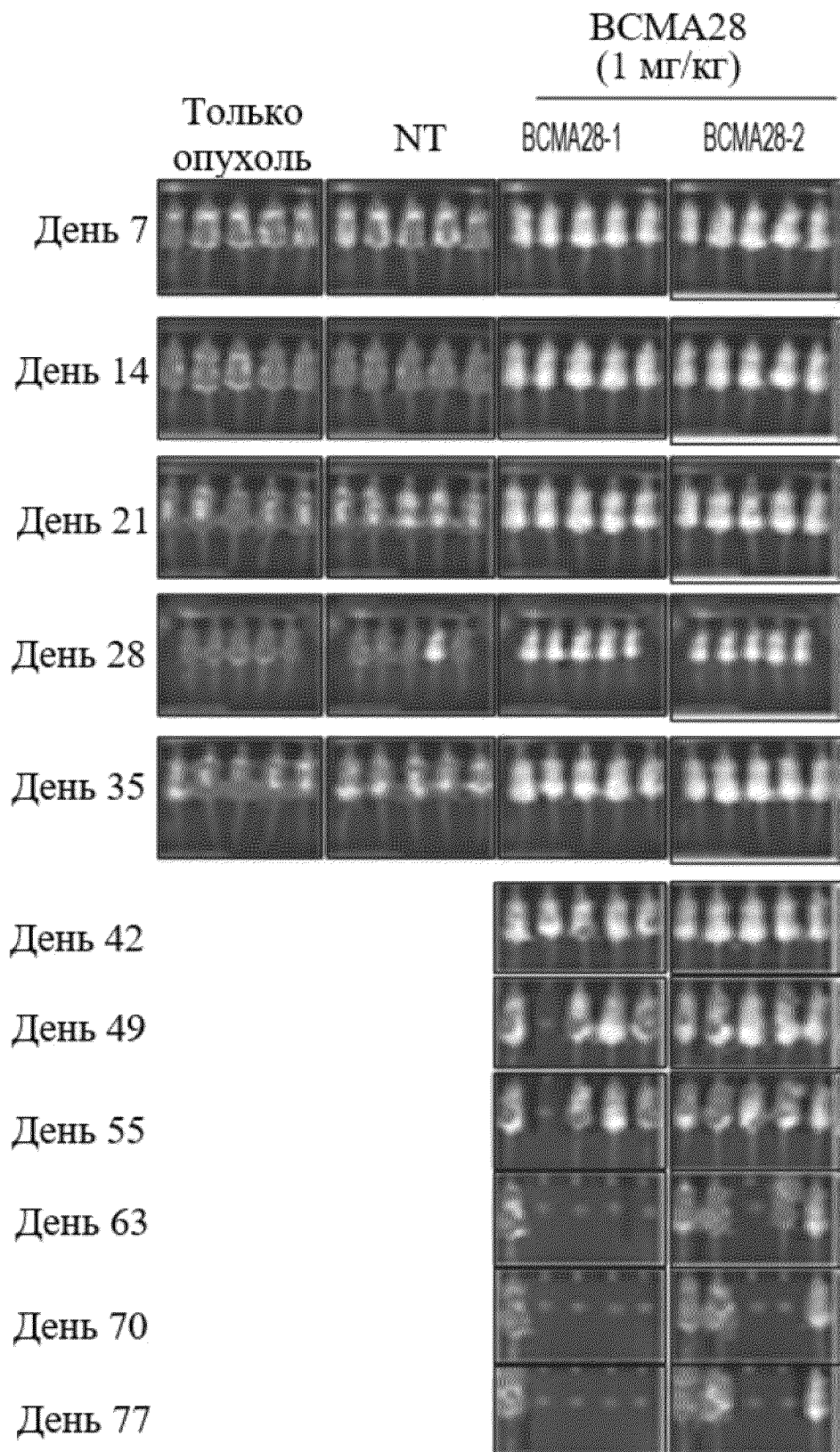


Изменение масштаба в
дни 28 и 35

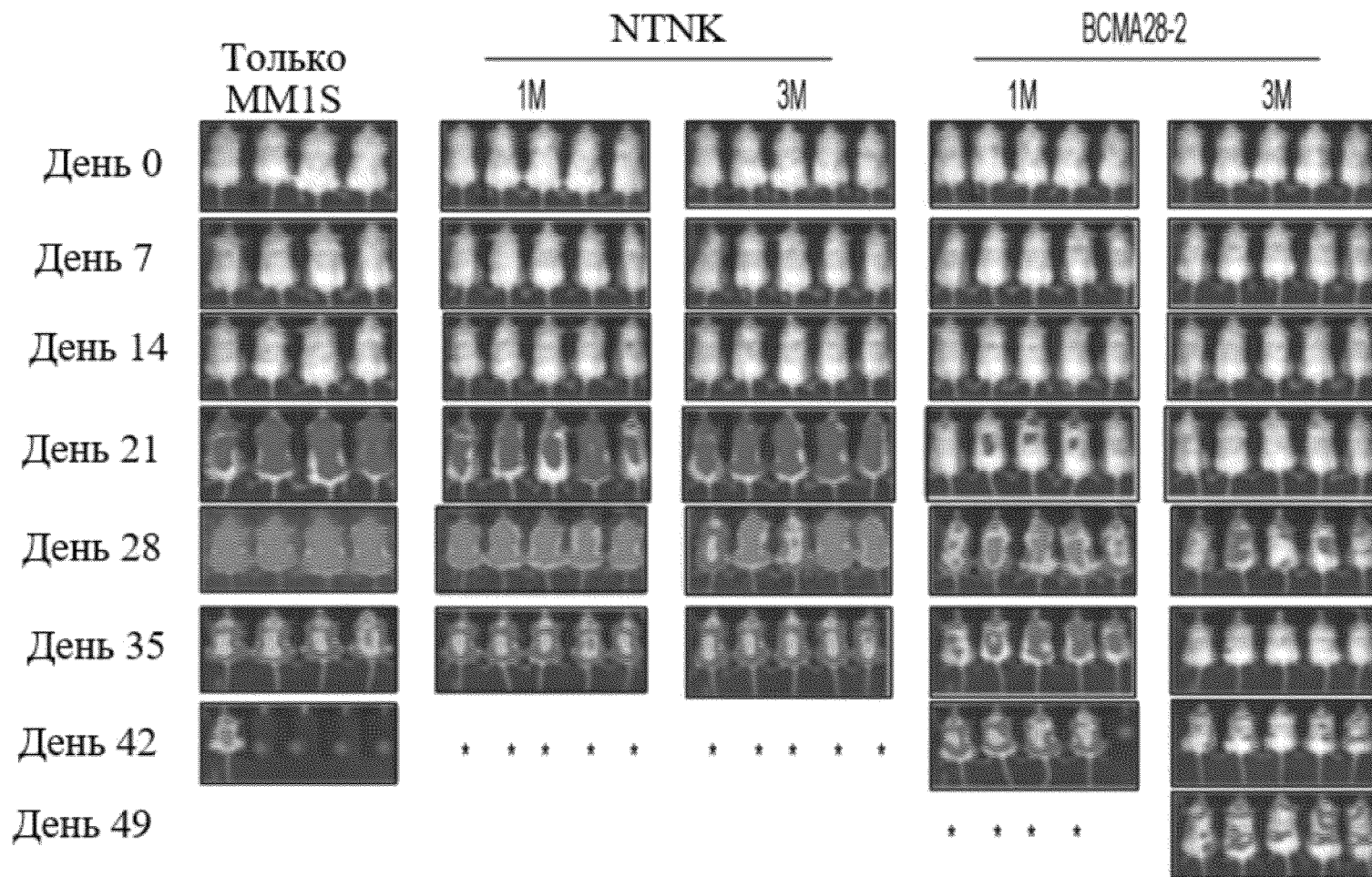


[Фиг. 4]

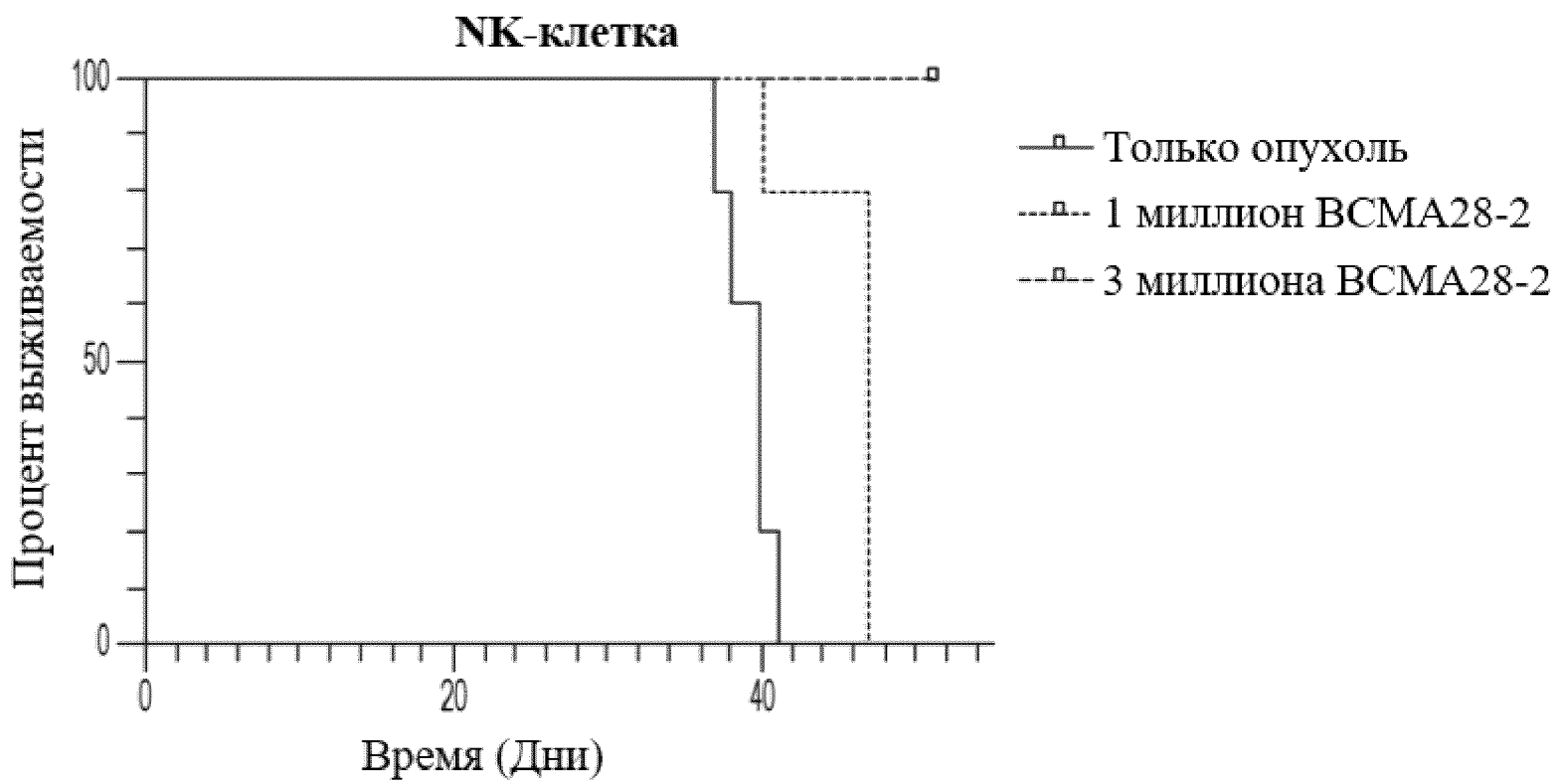
[Фиг. 5]



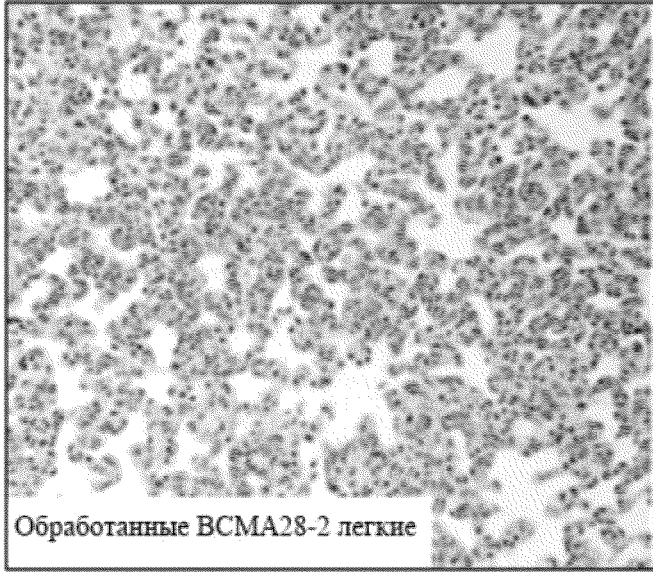
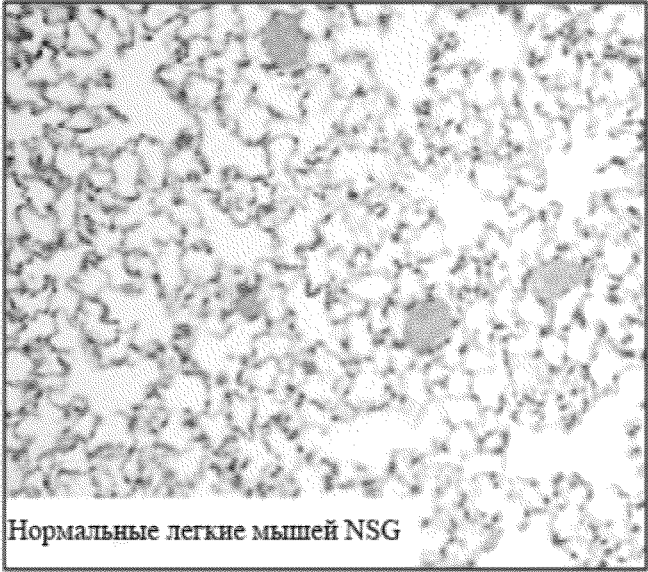
* Смерти, связанные с
токсичностью/опухоловой нагрузкой



[Фиг. 6]

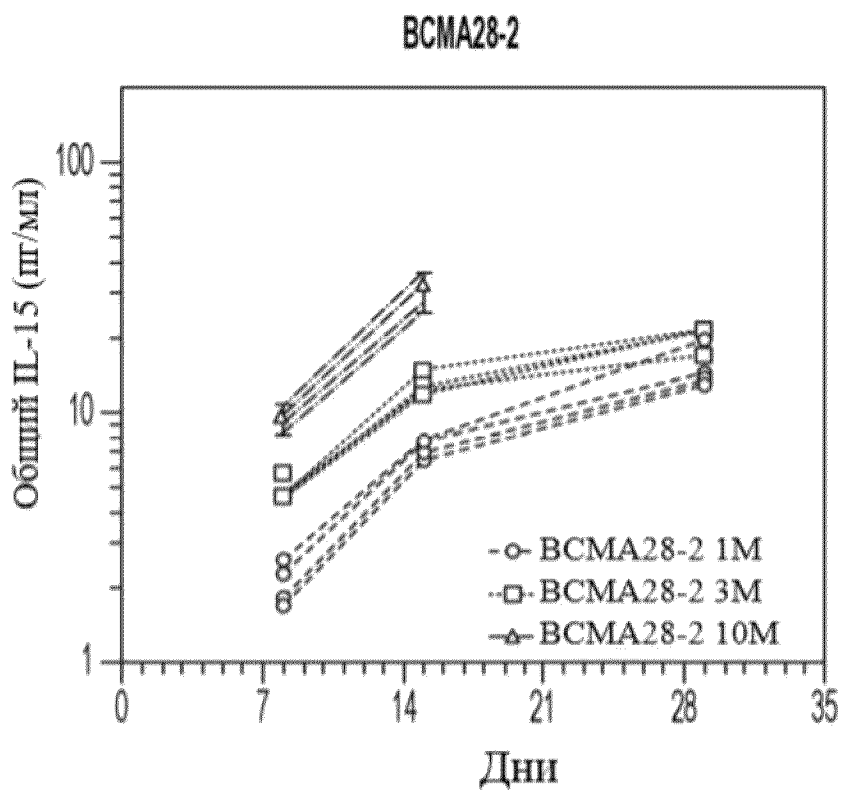


[Фиг. 7]

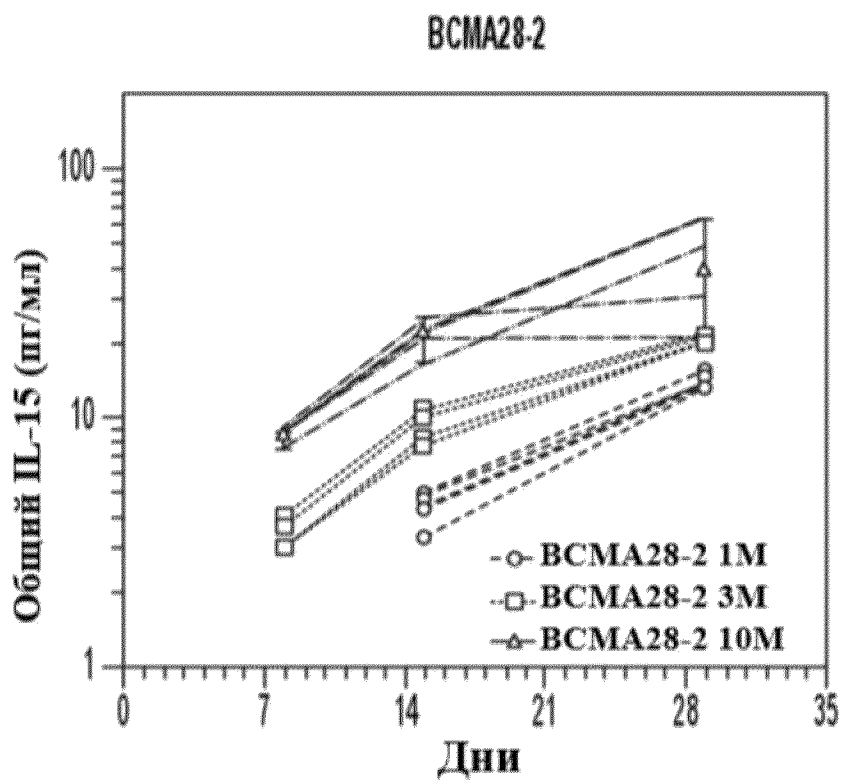


[Фиг. 8]

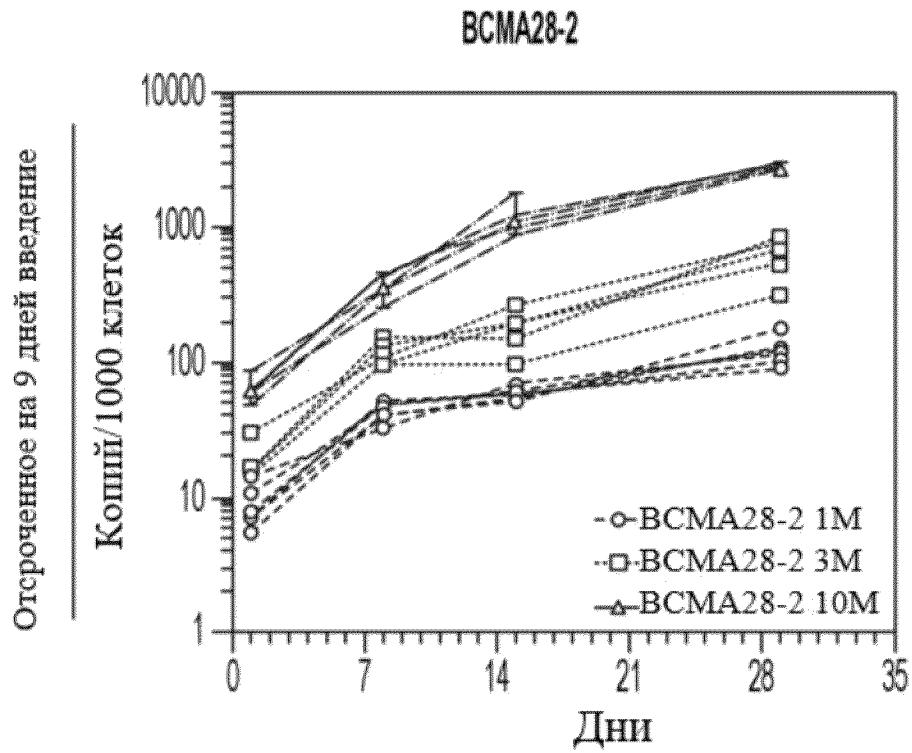
[Фиг. 9А]



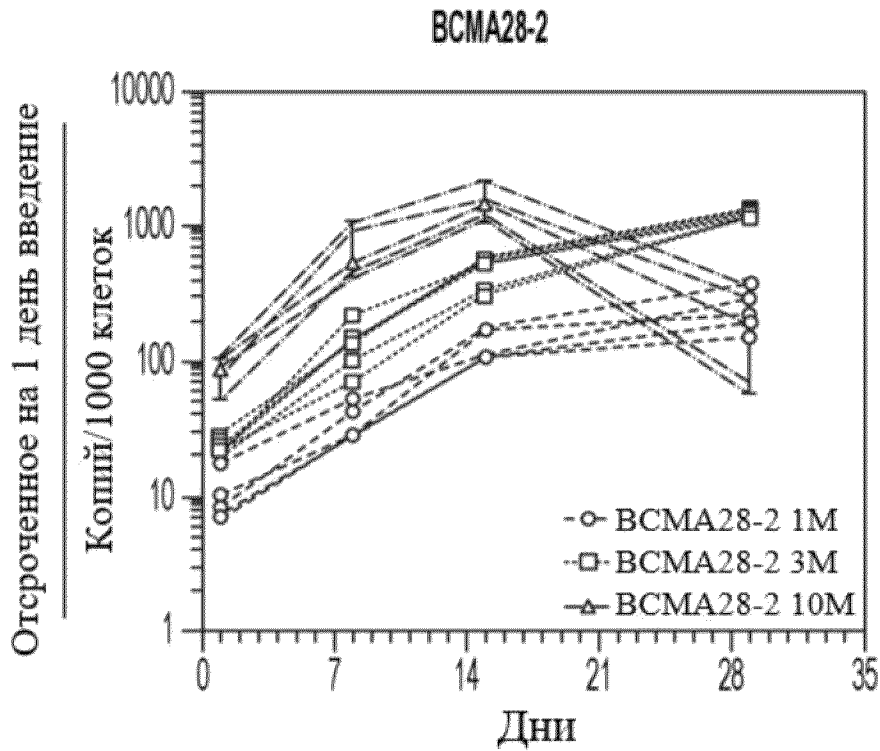
[Фиг. 9В]



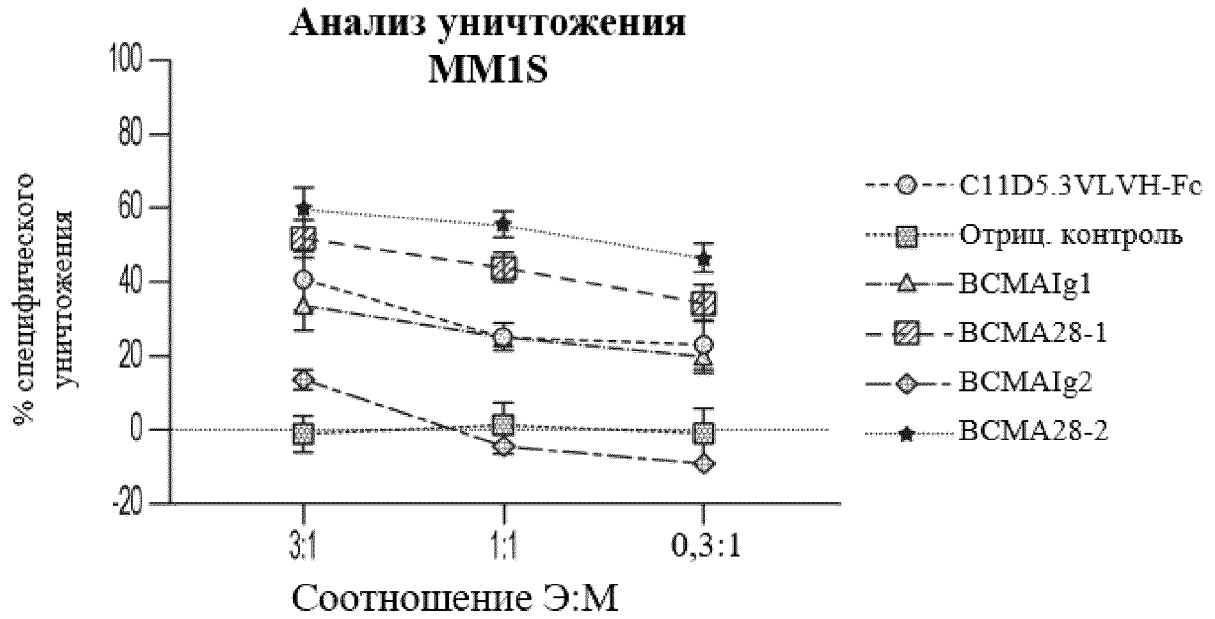
[Фиг. 9С]



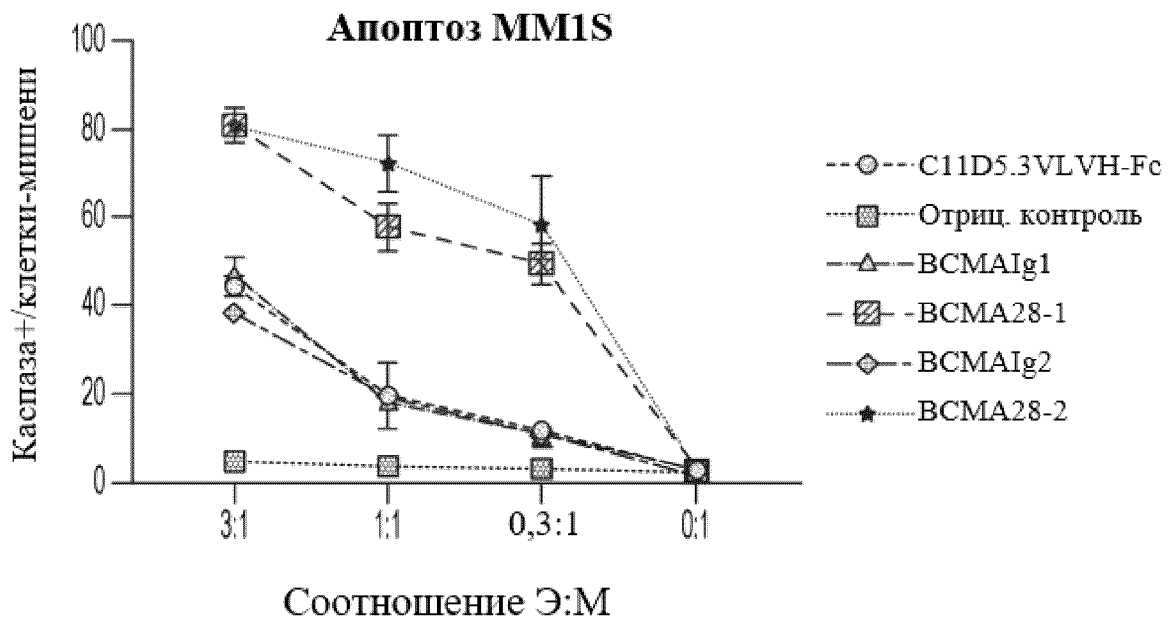
[Фиг. 9D]



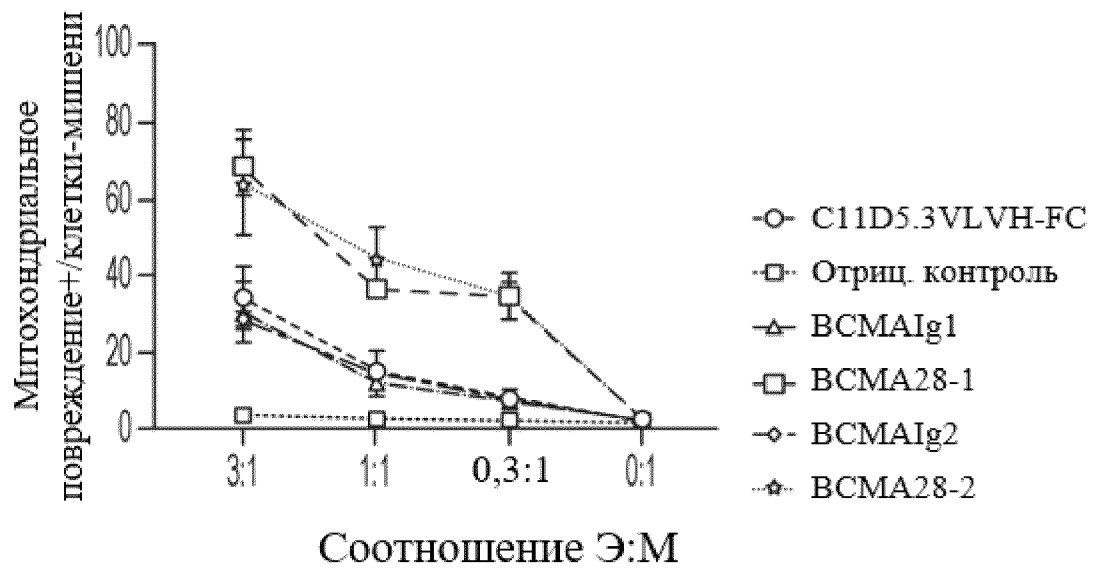
[Фиг. 10А]



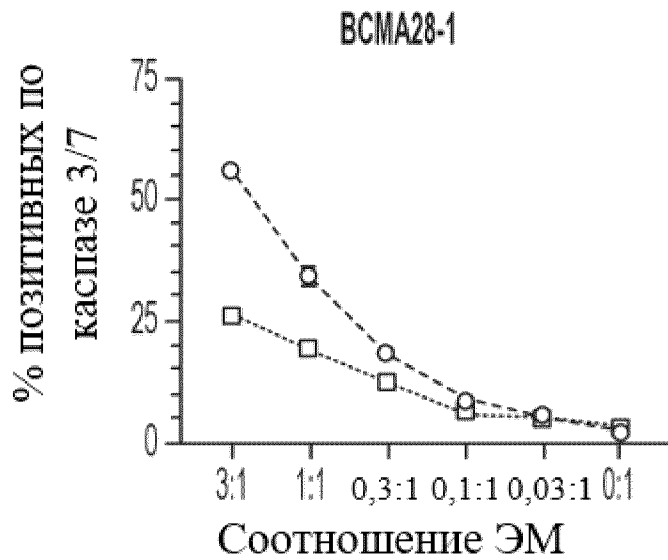
[Фиг. 10В]



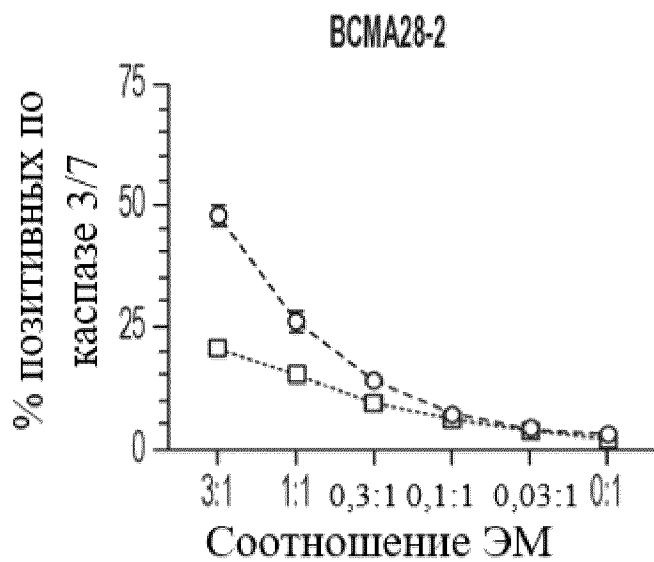
[Фиг. 10С]

Митохондриальное повреждение MM1S

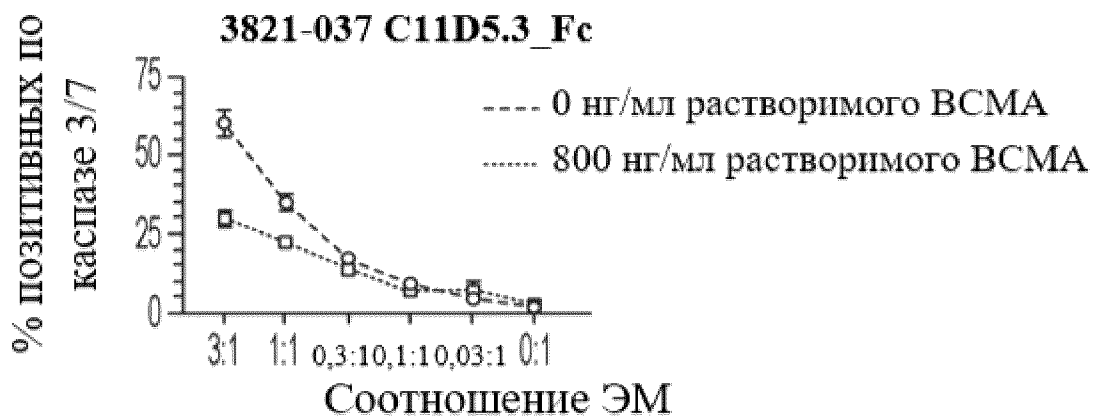
[Фиг. 11А]

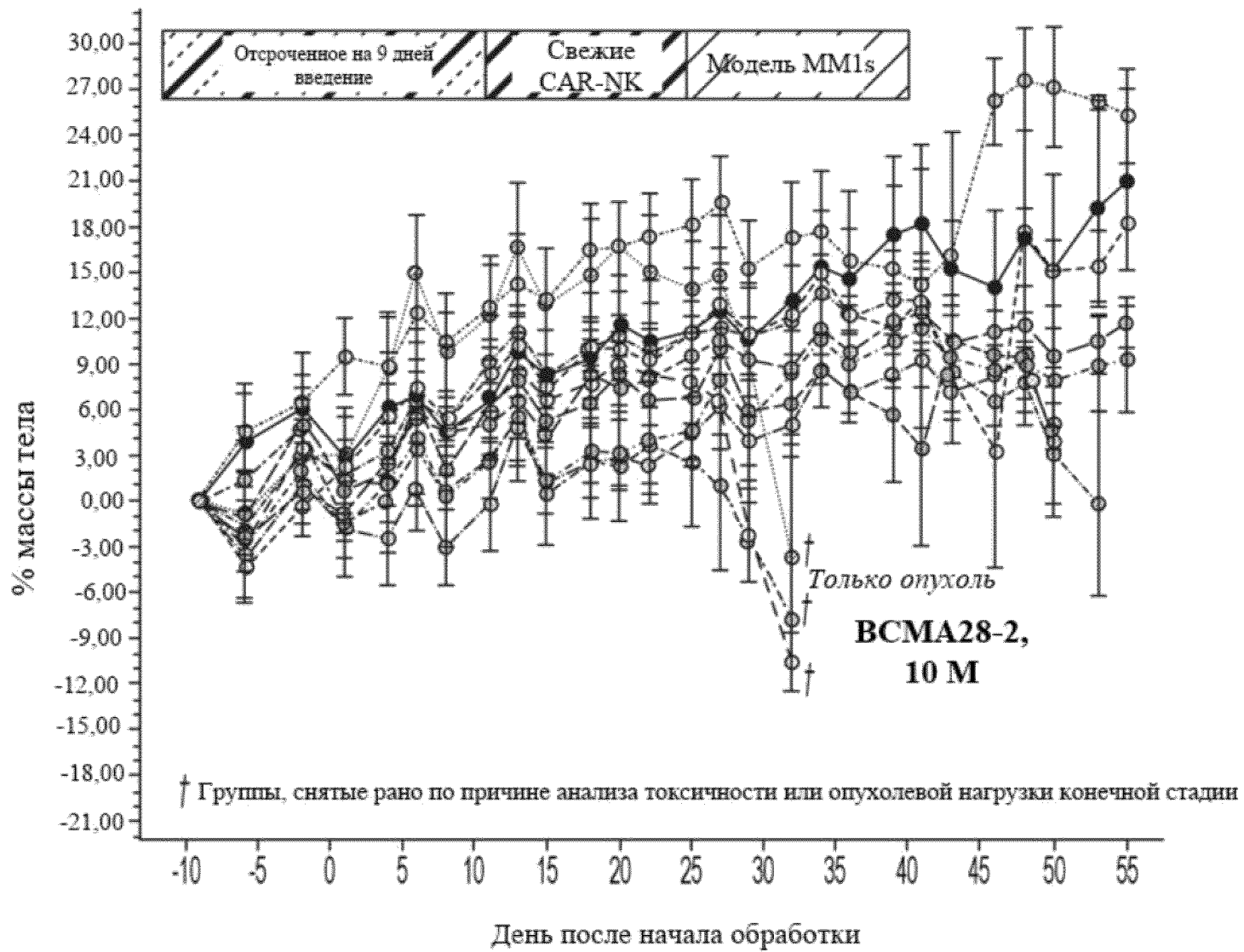


[Фиг. 11В]

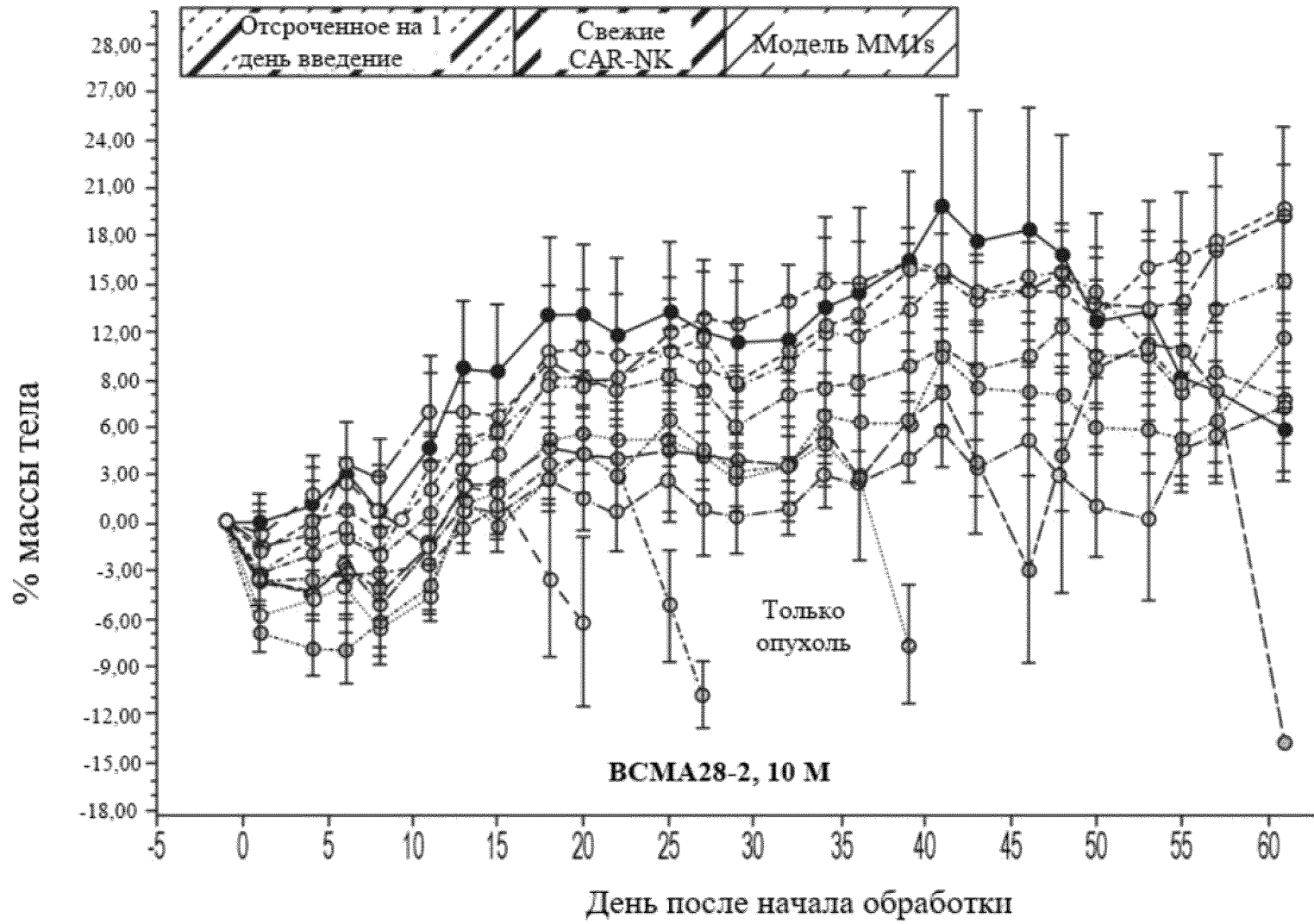


[Фиг. 11С]



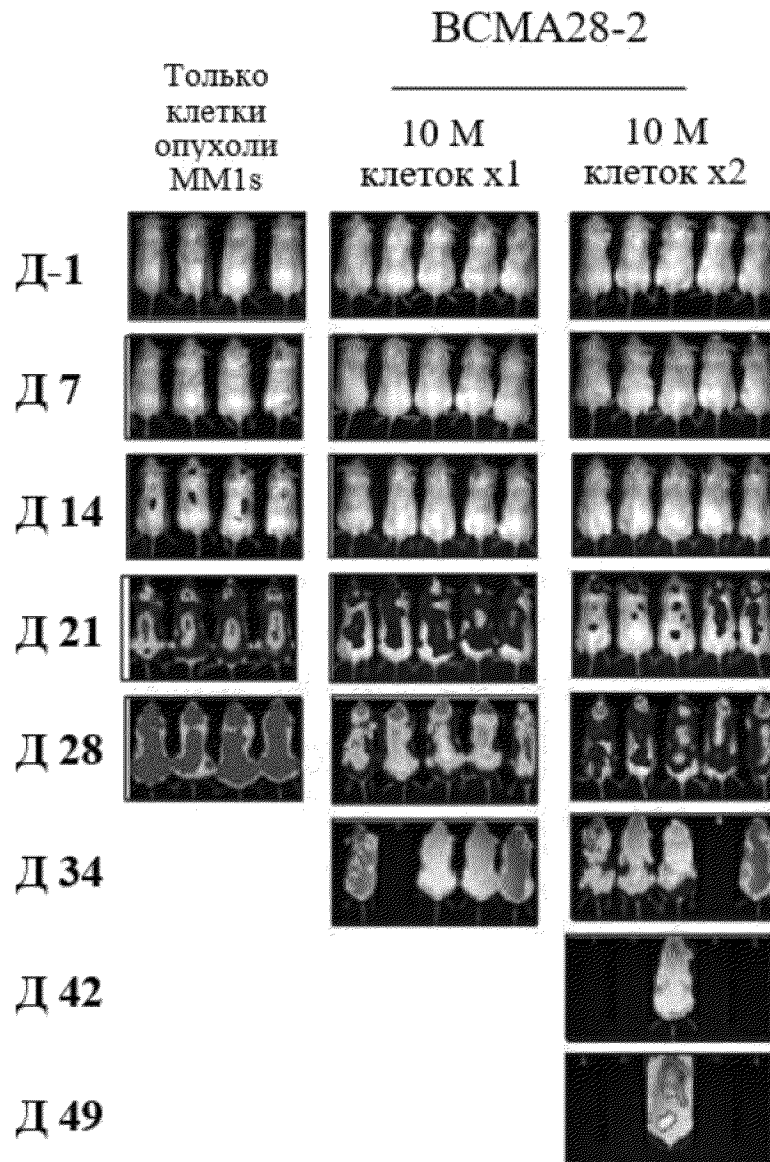


[Фиг. 12A]

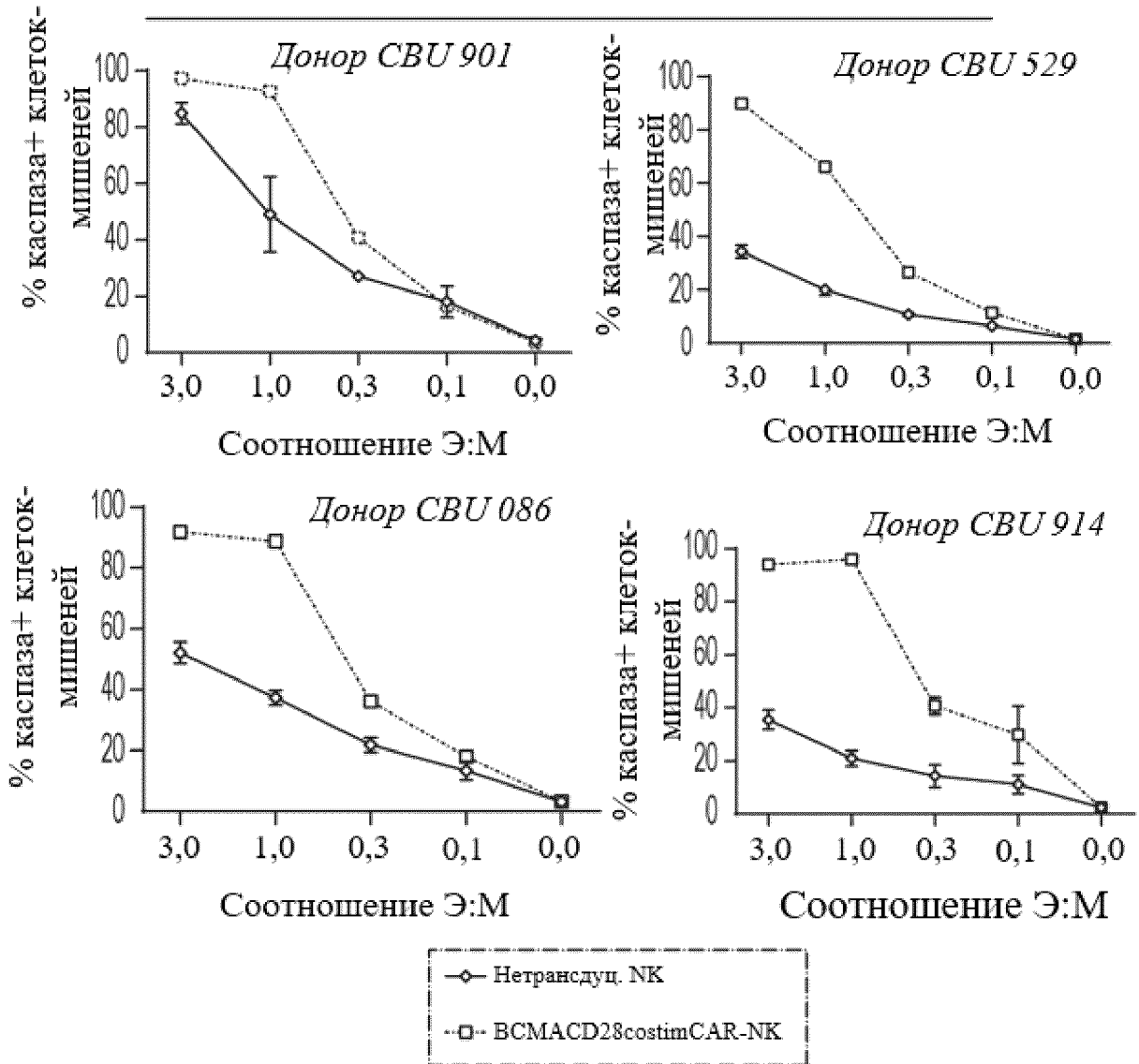


[Фиг. 12В]

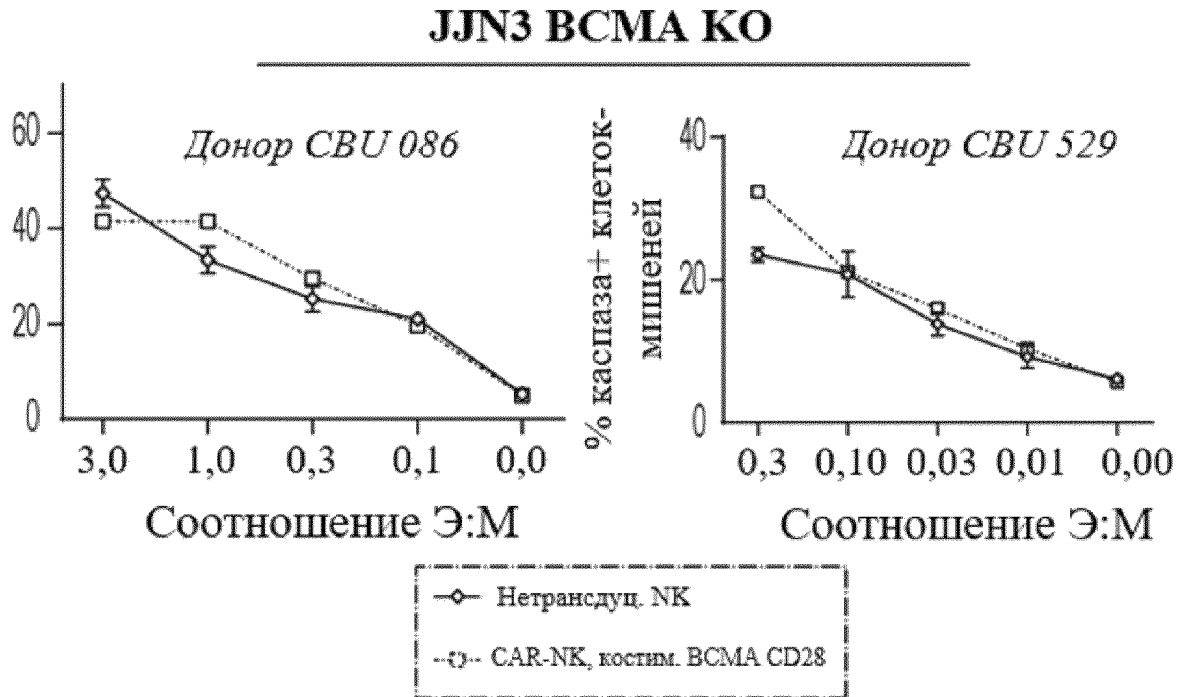
[Фиг. 13]



[Фиг. 14А]

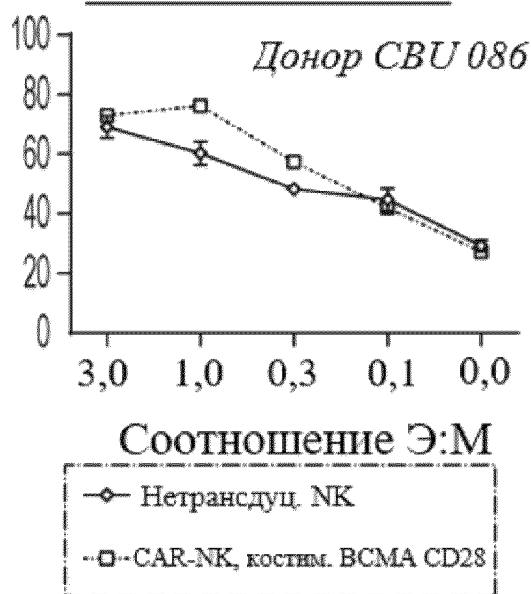
MM1s(BCMA^{низк.})

[Фиг. 14В]

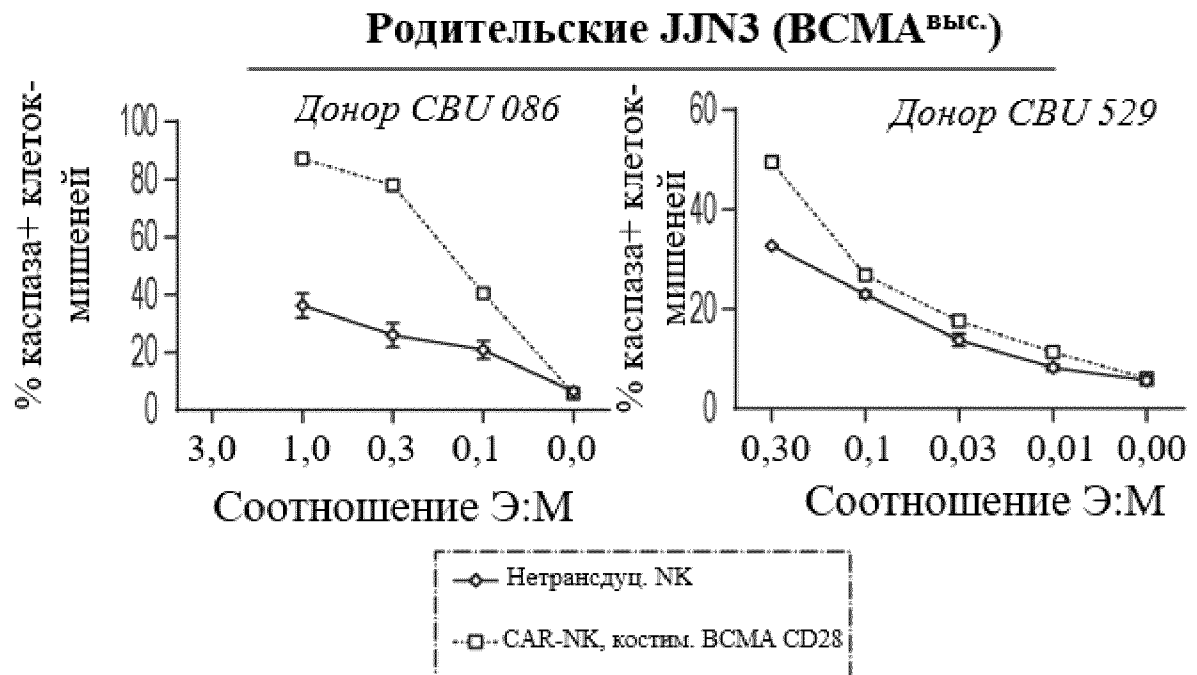


[Фиг. 14С]

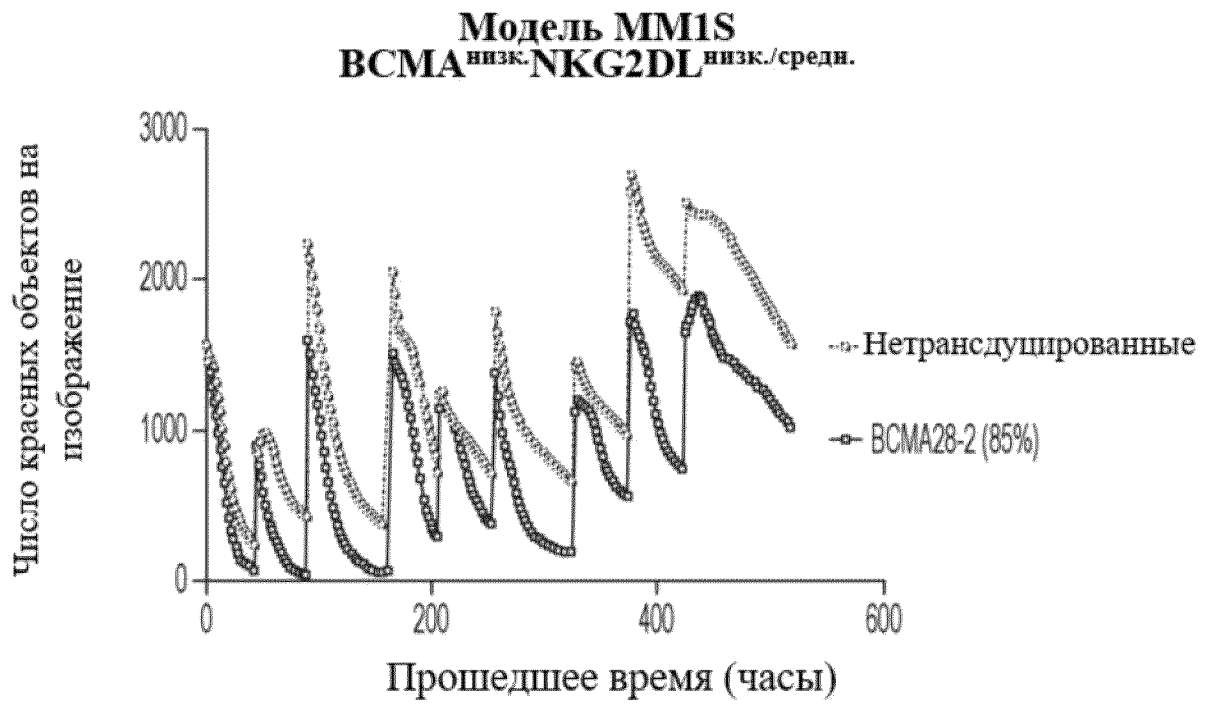
RPMI-8226 (ВСМА^{средн.})



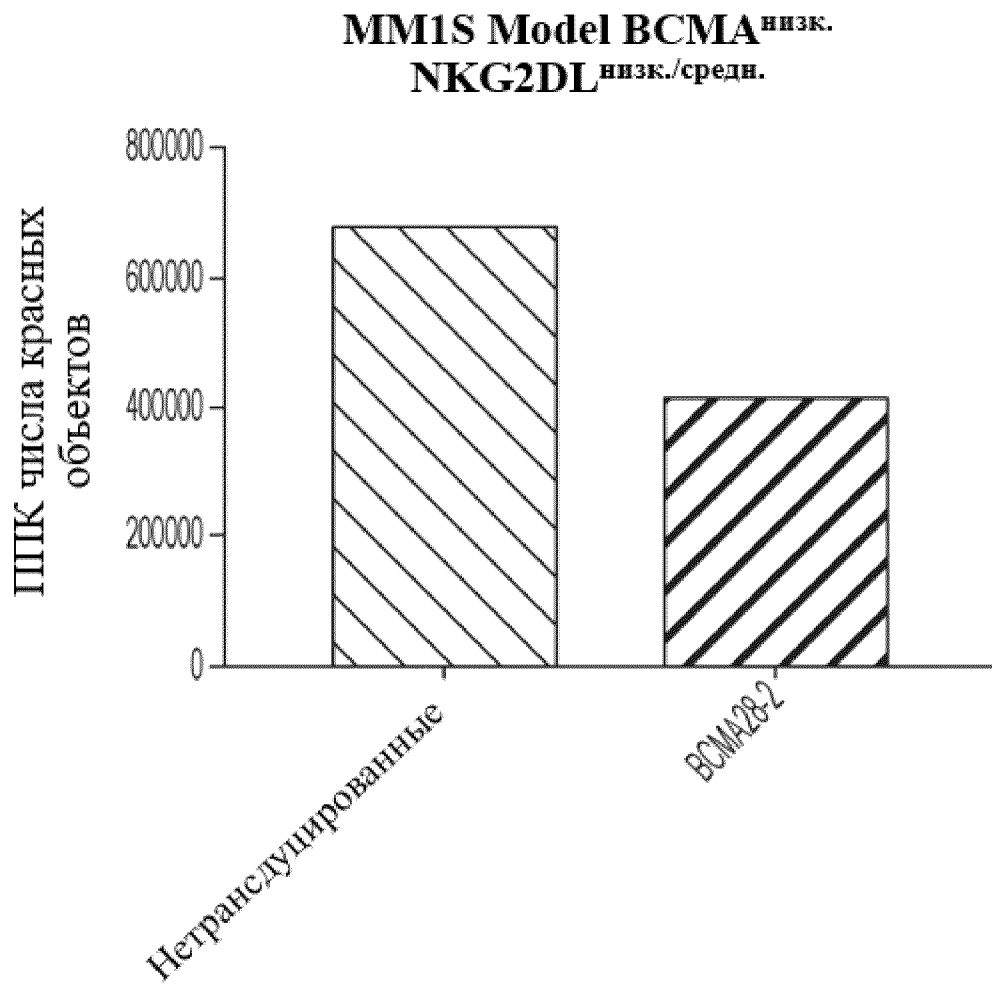
[Фиг. 14D]



[Фиг. 15А]



[Фиг. 15В]



[Фиг. 16]

