

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491076** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.07.31

(22) Дата подачи заявки
2017.08.10

(51) Int. Cl. *C07K 19/00* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) **ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ВСМА, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) PCT/CN2016/094408

(32) 2016.08.10

(33) CN

(62) 201990208; 2017.08.10

(71) Заявитель:
**ЛЕДЖЕНД БАЙОТЕК АЙРЛЕНД
ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:
**Фан Сяоху (CA), Чжуанг Цючуань,
Ван Пингуань, Ван Линь, Ян Лэй, Хао
Цзяин, Чжао Дань, Хэ Сянь (CN)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В данном изобретении предложены однодоменные антитела, нацеленные на ВСМА, и химерные антигенные рецепторы (такие как одновалентный CAR и мультивалентный CAR, включая двухэпитопный CAR), содержащие один или более анти-ВСМА однодоменных антител. Дополнительно предложены сконструированные иммунные эффекторные клетки (такие как Т-клетки), содержащие химерные антигенные рецепторы. Также предложены фармацевтические композиции, наборы и способы лечения рака.

A2

202491076

202491076

A2

ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ВСМА, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Эта заявка заявляет приоритет по международной патентной заявке № РСТ/CN2016/094408, поданной 10 августа 2016 года, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

Содержание следующего документа в текстовом файле ASCII включено в данное описание посредством ссылки в полном объеме: машиночитаемая форма (CRF) списка последовательностей (имя файла: 761422000640SEQLISTING.txt, дата записи: 10 августа 2017 года, размер: 520 KB).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ДАННОЕ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Данное изобретение относится к однодоменным антителам, химерным антигенным рецепторам, сконструированным иммунным эффекторным клеткам, которые нацеливаются на ВСМА и способам их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ДАННОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящее время с развитием иммунотерапии опухолей и медицинских технологий Т-клеточная иммунотерапия на основе химерных антигенных рецепторов (CAR-T) является одним из наиболее перспективных направлений в иммунотерапии опухолей. Как правило, химерный антигенный рецептор (CAR) включает внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Внеклеточный антигенсвязывающий домен может содержать одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), нацеленный на идентифицированный опухолевый антиген. CAR могут быть экспрессированы на поверхности Т-клеток с помощью методов трансфекции генов. При связывании с опухолевым антигеном-мишенью CAR могут активировать Т-клетки для запуска специфического противоопухолевого ответа

антигензависимым образом, что не ограничивается доступностью основного комплекса гистосовместимости (МНС), специфичного к опухолевому антигену-мишени.

Однодоменные антитела (sdAb) отличаются от обычных 4-цепочечных антител наличием одного переменного домена мономерного антитела. Например, представители семейства верблюдовых и акулы продуцируют sdAb, называемые антителами только с тяжелой цепью (HcAb), которые по своей природе не имеют легких цепей. Антигенсвязывающий фрагмент в каждом плече антитела только с тяжелой цепью в представителей семейства верблюдовых имеет один переменный домен тяжелой цепи ($V_{\text{H}}\text{H}$), который может характеризоваться высокой аффинностью к антигену без содействия легкой цепи. $V_{\text{H}}\text{H}$ у представителей семейства верблюдовых известен как наименьший функциональный антигенсвязывающий фрагмент с молекулярной массой около 15 кД.

Множественная миелома (ММ) представляет собой неизлечимую агрессивную злокачественную опухоль плазмы, которая классифицируется как неоплазия В-клеток и неконтролируемо пролиферирует в костном мозге, препятствуя нормальному метаболическому продуцированию клеток крови и обуславливая болезненные поражения костей (Garfall, A. L. et al., *Discovery Med.* 2014, 17, 37). Клинически множественная миелома может проявляться гиперкальциемией, почечной недостаточностью, анемией, костными поражениями, бактериальными инфекциями, повышенной вязкостью крови и амилоидозом (Robert Z. Orłowski, *Cancer Cell.* 2013, 24(3)). Согласно исследованиям и статистике, ежегодно миелома диагностируется у около 86 000 пациентов, при этом около 63 000 пациентов ежегодно умирают от осложнений, ассоциированных с этой патологией (Becker, 2011). Кроме того, из-за старения населения прогнозируется, что число случаев миеломы будет возрастать из года в год. Как и для многих видов рака, относительно множественной миеломы остается неизвестной причина заболевания и не разработано эффективное лечение. Некоторые способы лечения множественной миеломы являются аналогичными лечению других видов рака, например, химиотерапия или лучевая терапия, трансплантация стволовых клеток или трансплантация костного мозга, таргетная терапия или биологическая терапия (George, 2014). Клеточная иммунотерапия на основе антител продемонстрировала существенную клиническую эффективность у пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями, особенно при В-клеточной неходжкинской лимфоме. Несмотря на то, что благодаря современным методам лечения множественной миеломы часто можно достичь ремиссии, почти у всех пациентов в

конечном итоге развиваются рецидивы. Поэтому существует потребность в эффективном иммунотерапевтическом агенте для лечения множественной миеломы.

LCAR-B38M, описанный в данном изобретении, представляет собой двухвалентный CAR-T, нацеленный на BCMA, который уже продемонстрировал клинические преимущества с точки зрения безопасности и эффективности при лечении пациентов с рефрактерной или рецидивирующей множественной миеломой в клиническом исследовании. В клиническом исследовании ранней фазы, у 33 из 35 (94 %) пациентов наблюдали клиническую ремиссию множественной миеломы после лечения с применением клеток LCAR-B38M CAR-T. У большинства пациентов были только легкие побочные эффекты. Это исследование было представлено главным автором изобретения на ежегодной конференции ASCO 2017 (Тезисы LBA3001) и на брифинге для прессы, который широко освещался в средствах массовой информации (<http://www.ascopost.com/News/55713>).

В целом, показатель частоты объективного ответа составил 100 %, и 33 пациента (94 %) достигли очевидной клинической ремиссии миеломы (полный ответ, очень хороший частичный ответ или частичный ответ) в течение 2 месяцев лечения с применением клеток CAR T. После наблюдения за группой в течение более 4 месяцев и оценки эффективности, 14 пациентов из 19 достигли критериев строгого полного ответа, 1 пациент достиг частичного ответа, и 4 пациента достигли критериев очень хорошей частичной ремиссии.

Поскольку отличный профиль эффективности и безопасности, полученный в клинических исследованиях LCAR-B38M, значительно превосходит профиль, полученный в нескольких других исследованиях BCMA CAR-T, о котором также сообщалось на конференции ASCO, работы были широко признаны «революционным прорывом» в области иммунотерапии. Примечательно, что все эти конструкции BCMA CAR являются обычными CAR, в которых домен, связывающий антиген BCMA, состоит из одновалентного антитела ScFv.

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ДАННОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном изобретении предлагаются анти-BCMA однодоменные антитела (sdAb), химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие один или большее количество

антиBCMA sdAb (такие как V_HH-фрагменты), сконструированные иммунные эффекторные клетки и способы их применения при иммунотерапии рака.

В одном аспекте данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее CDR-области любой одной из SEQ ID NO: 115-152. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит любую из следующих областей: (1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77; (2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78; (3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79; (4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; (5) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81; (6) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; (7) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83; (8) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84; (9) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; (10) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; и CDR3, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 71; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109; (34) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; (35) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111; (36) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; (37) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113; или (38) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115-152.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антиBCMA антитело только с тяжелой цепью (НСАВ) или антигенсвязывающий белок, содержащий любое из описанных выше анти-BCMA sdAb. Также предлагаются эпитопы BCMA, которые специфически связываются с любым из описанных выше анти-BCMA sdAb, и анти-BCMA антитела (такие как анти-BCMA sdAb), которые конкурируют с любым из описанных выше анти-BCMA sdAb.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в соответствии с любым из описанных выше анти-BCMA sdAb, анти-BCMA sdAb представляет собой верблюжье антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиBCMA sdAb представляет собой химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb представляет собой фрагмент V_HH.

В одном аспекте данного изобретения предлагается химерный антигенный рецептор ВСМА, который содержит полипептид, содержащий: а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-ВСМА sdAb (такой как любое одно из анти-ВСМА sdAb, описанное выше); (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является одновалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является мультивалентным (например, двухвалентным или трехвалентным). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является мультиспецифическим (например, биспецифическим). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере два анти-ВСМА sdAb (такие как любое одно или более анти-ВСМА sdAb, описанных выше).

В одном аспекте данного изобретения предлагается мультивалентный химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит полипептид, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый ВСМА-связывающий фрагмент и второй ВСМА-связывающий фрагмент; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество из первого ВСМА-связывающего фрагмента и второго ВСМА-связывающего фрагмента представляет собой анти-ВСМА sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой первое анти-ВСМА sdAb, а второй ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой второе анти-ВСМА sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой анти-ВСМА sdAb, а второй ВСМА-связывающий фрагмент является производным от человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой анти-ВСМА sdAb, а второй ВСМА-связывающий фрагмент является полипептидным лигандом ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент и второй ВСМА-связывающий фрагмент специфически связываются с одним и тем же эпитопом на ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент и второй ВСМА-связывающий фрагмент специфически связываются с разными эпитопами на ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент и/или второй

ВСМАсвязывающий фрагмент специфически связываются с эпитопом на ВСМА, производным от аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 388-394. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом, производным от SEQ ID NO: 389 и/или 390. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второй ВСМА-связывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом, производным от SEQ ID NO: 391 и/или 392.

В одном аспекте данного изобретения предлагается мультивалентный (такой как двухвалентный или трехвалентный) химерный антигенный рецептор, который содержит полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое анти-ВСМА sdAb (такое как любой из анти-ВСМА sdAb, описанных выше), и второе анти-ВСМА sdAb (такое как любое из описанных выше анти-ВСМА sdAb); (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-ВСМА sdAb и второе анти-ВСМА sdAb специфически связываются с одним и тем же эпитопом на ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-ВСМА sdAb и второе анти-ВСМА sdAb специфически связываются с разными эпитопами на ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-ВСМА sdAb и/или второе анти-ВСМА sdAb специфически связывается с эпитопом на ВСМА, производным от аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 388-394. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-ВСМА sdAb специфически связывается с эпитопом, производным от SEQ ID NO: 389 и/или 390. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второе анти-ВСМА sdAb специфически связывается с эпитопом, производным от SEQ ID NO: 391 и/или 392.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в соответствии с любым из мновалентных CAR, описанных выше, первый ВСМА-связывающий фрагмент (например, первое анти-ВСМА sdAb) расположен на N-конце второго ВСМАсвязывающего фрагмента (например, второго анти-ВСМА sdAb). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент (например, первое анти-ВСМА sdAb) расположен на C-конце второго ВСМА-связывающего фрагмента (например, второго анти-ВСМА sdAb). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент (например, первое анти-ВСМА sdAb) и второй ВСМА-связывающий фрагмент (например, второе анти-ВСМА sdAb) являются непосредственно слитыми друг с другом с помощью пептидной

связи. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент (например, первое анти-ВСМА sdAb) и второй ВСМА-связывающий фрагмент (например, второе анти-ВСМА sdAb) являются слитыми друг с другом с помощью пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 208-215.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, согласно любому из CAR (включая мультивалентные CAR), описанных выше, трансмембранный домен является производным от молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен является производным от CD8 α или CD28. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193 или 194.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, согласно любому из CAR (включая мультивалентные CAR), описанных выше, внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен является производным от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197 или 198.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, согласно любому из CAR (включая мультивалентные CAR), описанных выше, внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен является производным от костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен содержит цитоплазматический домен CD28 и/или цитоплазматический домен CD137. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195 и/или SEQ ID NO: 196.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, согласно любому из CAR (включая мультивалентные CAR), описанных выше, CAR дополнительно содержит шарнирный домен, расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен является производным от CD8 α . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 192.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, согласно любому из CAR (включая мультивалентные CAR), описанных выше, CAR дополнительно содержит сигнальный пептид, расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид является производным от молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 α , ГМКСФ-рецептора α и тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид является производным от CD8 α . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191.

В одном аспекте данного изобретения предлагается CAR, как указано в Таблицах 4 и 5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 216-256 и 298-335.

В одном аспекте данного изобретения предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115-152, 216-256 и 298-335.

В одном аспекте данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любое одно из анти-BCMA sdAb или CAR (включая мультивалентные CAR), описанные выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения последовательность нуклеиновой кислоты выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 153-190, 257-297 и 336-373. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый CAR, при этом вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CAR, является функционально связанной с первой последовательностью нуклеиновой кислоты посредством третьей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид, такой как пептид T2A,

P2A или F2A. При этом третья последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой SEQ ID NO: 385. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК.

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

В одном аспекте данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка, содержащая любой один из CAR (включая мультивалентные CAR), описанных выше, или любую одну из выделенных нуклеиновых кислот, описанных выше, или любой из векторов, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, моноклеарную клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку.

В одном аспекте данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая любую из сконструированных иммунных эффекторных клеток, описанных выше, и фармацевтически приемлемый носитель. Дополнительно предлагается способ лечения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества любой из фармацевтических композиций, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой множественную миелому, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой солидный рак, такой как глиобластома. В некоторых

вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой рефрактерную или рецидивирующую множественную миелому.

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

Также предлагаются способы применения, наборы и готовые изделия, содержащие любое одно из анти-BCMA sdAb, CAR (включая мультивалентные CAR), сконструированные иммунные эффекторные клетки, выделенные нуклеиновые кислоты или векторы, описанные выше.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1A-1B приведены результаты анализа цитотоксичности Т-клеток *in vitro*, экспрессирующих типовые моноспецифические CAR, содержащие различные анти-BCMA sdAb против клеток RPMI8226.Luc (Фиг. 1A) или клеток U87MG.Luc (Фиг. 1B).

На Фиг. 2A-2C приведены результаты анализа цитотоксичности Т-клеток *in vitro*, экспрессирующих типовые моноспецифические CAR, содержащие различные анти-BCMA sdAb против клеток RPMI8226.Luc (Фиг. 2A), клеток K562. BCMA.Luc (Фиг. 2B) или клеток K562. CD19.Luc (Фиг. 2C).

На Фиг. 3 приведены результаты анализа высвобождения IFN γ Т-клетками *in vitro*, экспрессирующими типовые моноспецифические CAR, содержащие различные анти-BCMA sdAb против клеток K562. BCMA.Luc.

На Фиг. 4A-4C приведены результаты анализа цитотоксичности Т-клеток *in vitro*, экспрессирующих типовые мультивалентные BCMA CAR против клеток RPMI8226.Luc (Фиг. 4A-4B) или клеток U87MG.Luc (Фиг. 4C).

На Фиг. 5A-5E приведены результаты анализа цитотоксичности Т-клеток *in vitro*, экспрессирующих типовые двухвалентные BCMA CAR против клеток RPMI8226.Luc (Фиг. 5A), клеток K562. CD19.Luc (Фиг. 5B), клеток A549.Luc (Фиг. 5C), клеток U87MG.Luc (Фиг. 5D) или клеток Raji.Luc (Фиг. 5E).

На Фиг. 5F приведены результаты анализа цитотоксичности Т-клеток *in vitro*, экспрессирующих типовые двухвалентные BCMA CAR против клеток K562. BCMA.Luc и клеток K562.CD38.Luc.

На Фиг. 6А приведены результаты анализа высвобождения IFN γ Т-клетками *in vitro*, экспрессирующими типовые двухвалентные ВСМА CAR против клеток K562. ВСМА.Luc с двумя разными соотношениями эффекторных клеток к клеткам-мишеням.

На Фиг. 6В приведены результаты анализа высвобождения IFN γ Т-клетками *in vitro*, экспрессирующими типовые двухвалентные ВСМА CAR против клеток RPMI8226.Luc, A549.Luc, K562.CD38.Luc и клеток Raji.Luc.

На Фиг. 7А-7С продемонстрировано связывание трех типовых фрагментов VHH с клетками K562. ВСМА.Luc и клетками K562.CD38.Luc (отрицательный контроль).

На Фиг. 8А продемонстрирована кристаллическая структура внеклеточного домена ВСМА. На Фиг. 8В продемонстрированы пептиды эпитопа ВСМА.

На Фиг. 9А-9В приведены результаты анализа эпитопного картирования VHH1 и VHH2.

На Фиг. 10 приведены результаты конкурентного анализа связывания с применением клеток CHO-ВСМА.

На Фиг. 11 продемонстрирована цитотоксичность *in vitro* полученных от донора Тклеток, экспрессирующих LCAR-B38M против клеток RPMI8226.Luc.

На Фиг. 12А продемонстрирована цитотоксичность LCAR-B38M CAR-Т-клеток *in vitro*, полученных от выбранного донора, против клеток RPMI8226.Luc. На Фиг. 12В-12Е продемонстрирована противоопухолевая активность LCAR-B38M CAR-Т-клеток *in vivo* в модели ксенотрансплантата опухоли у мышей. На Фиг. 12В приведены данные биоломинесцентной визуализации у мышей, получавших LCAR-B38M CAR-Т, и мышей, получавших нетрансдуцированные Т-клетки (UnT). На Фиг. 12С продемонстрирован дизайн исследования и биоломинесцентные изображения мышей в группе CAR-Т и в группе UnT. На Фиг. 12D продемонстрированы изображения печени мышей, получавших UnT. На Фиг. 12Е продемонстрирован люциферазный анализ *ex vivo*, подтверждающий опухоли в печени мышей, получавших UnT.

На Фиг. 13А-13F продемонстрированы клинические параметры двух обезьян, получавших LCAR-B38M CAR-Т-клетки. Клинические параметры, контролируемые в исследовании, включали температуру тела (Фиг. 13А), вес тела (Фиг. 13В), общий анализ крови (ОАК, Фиг. 13С и 13D), а также биохимический анализ сыворотки и уровни цитокинов (Фиг. 13Е и 13F).

На Фиг. 14А-С продемонстрированы анализы цитотоксичности LCAR-B38M CART-клеток и LCAR-B27S CAR-Т-клеток, полученных от тех же трех пациентов с множественной миеломой соответственно. На Фиг. 14А продемонстрированы результаты

цитотоксичности LCAR-B38M CAR-T-клеток и LCAR-B27S CAR-T-клеток *in vitro*, полученных от пациента А с множественной миеломой. На Фиг. 14В продемонстрированы результаты цитотоксичности LCAR-B38M CAR-T-клеток и LCARB27S CAR-T-клеток *in vitro*, полученных от пациента В с множественной миеломой. На Фиг. 14С продемонстрированы результаты цитотоксичности LCAR-B38M CAR-T-клеток и LCAR-B27S CAR-T-клеток *in vitro*, полученных от пациента С с множественной миеломой.

На Фиг. 15А приведено сравнение структуры CAR на основе V_{HH} и обычного CAR на основе scFv. Схематическая структура слева демонстрирует типовой моноспецифический одновалентный CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит домен V_{HH} . Схематическая структура справа демонстрирует типовой моноспецифический одновалентный CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит домен scFv.

На Фиг. 15В приведено сравнение структуры CAR на основе V_{HH} , имеющего два антигенсвязывающих участка, и обычного CAR на основе scFv, имеющего два антигенсвязывающих участка. Схематическая структура слева демонстрирует типовой CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит два домена V_{HH} . Два домена V_{HH} могут быть одинаковыми или разными. Схематическая структура справа демонстрирует типовой CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит домен scFv. Два домена scFv могут быть одинаковыми или разными.

На Фиг. 15С продемонстрированы схематические структуры типовых двухвалентных и биспецифических CAR на основе V_{HH} . Схематическая структура на верхней левой панели иллюстрирует типовой одноэпитопный, двухвалентный CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий два идентичных домена V_{HH} , каждый из которых специфически связывается с эпитопом 1 антигена А. Схематическая структура на верхней правой панели иллюстрирует типовой двухэпитопный, двухвалентный CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый домен V_{HH} , специфически связывающийся с эпитопом 1 антигена А, и второй домен V_{HH} , специфически связывающийся с эпитопом 2 антигена А. Эпитоп 1 и эпитоп 2 антигена А могут отличаться по своей структуре и/или последовательностям. Схематическая структура в нижней левой панели иллюстрирует типовой биспецифический CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый домен V_{HH} , специфически связывающийся с антигеном А, и второй

домен $V_{\text{H}}\text{H}$, специфически связывающийся с антигеном В. Антиген А и антиген В представляют собой разные антигены.

На Фиг. 15D продемонстрированы схематические структуры типовых CAR на основе $V_{\text{H}}\text{H}$, имеющих три или большее количество доменов $V_{\text{H}}\text{H}$. CAR могут иметь множество доменов $V_{\text{H}}\text{H}$, слитых друг с другом непосредственно или посредством пептидных линкеров. Домены $V_{\text{H}}\text{H}$ могут быть одинаковыми или разными. Различные домены $V_{\text{H}}\text{H}$ могут специфически связываться с различными эпитопами на одном и том же антигене или на разных антигенах.

На Фиг. 15E продемонстрированы типовые сконструированные иммунные эффекторные клетки, коэкспрессирующие два разных CAR на основе $V_{\text{H}}\text{H}$. Типовые сконструированные иммунные эффекторные клетки на левой панели коэкспрессируют два разных моносpezifических одновалентных CAR. Типовые сконструированные иммунные эффекторные клетки на средней панели коэкспрессируют моносpezifический, моновалентный CAR и бисpezifический или двухвалентный CAR. Типовые сконструированные иммунные эффекторные клетки на правой панели коэкспрессируют два разных бисpezifических или двухвалентных CAR. CAR могут распознавать разные антигены.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ДАННОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном изобретении предлагаются однодоменные антитела анти-BCMA и химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий один или большее количество BCMA-связывающих фрагментов (таких как анти-BCMA sdAb). Также предлагаются мультивалентные CAR, содержащие по меньшей мере два связывающие фрагменты (такие как sdAb), которые специфически связываются с одним антигеном. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются мультивалентные (такие как двухвалентные или трехвалентные) CAR, содержащие по меньшей мере два анти-BCMA sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере два анти-BCMA sdAb представляют собой различные анти-BCMA sdAb, которые специфически связываются с различными эпитопами на BCMA. Анти-BCMA sdAb, CAR и сконструированные иммунные клетки, экспрессирующие CAR, описанные в данном изобретении, являются пригодными агентами для лечения рака.

Примечательно, что в данном изобретении продемонстрирована превосходная эффективность двухвалентных двухэпитопных CAR, содержащих два анти-BCMA sdAb,

нацеленных на различные эпитопы ВСМА (например, LCAR-B38M), при лечении множественной миеломы у пациентов. При промежуточном анализе результатов клинических исследований фазы I/II, 100% пациентов с рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломой ответили на лечение LCAR-B38M CAR-T. 94% пациентов достигли клинической ремиссии миеломы в течение 2 месяцев лечения с применением CAR-T. Пациенты, достигшие критериев строгого полного ответа (сПО), не имели симптомов заболевания или имели минимальные остаточные признаки заболевания после более чем года лечения с применением CAR-T. Кроме того, лечение с применением LCAR-B38M CAR-T хорошо переносилось пациентами, поскольку у большинства пациентов наблюдали только легкие и контролируемые признаки синдрома высвобождения цитокинов, что является общим побочным эффектом терапии на основе CAR-T-клеток. Неврологические побочные эффекты не наблюдались ни у одного из пациентов. Для сравнения, пилотное клиническое исследование одновалентного CAR, содержащего одно анти-ВСМА sdAb, продемонстрировало более низкие показатели частоты объективного ответа и частоты полной ремиссии и более высокий показатель частоты рецидива среди пролеченных пациентов. До этого изобретения, все ВСМА CAR в клинических исследованиях имели только один ВСМА-связывающий фрагмент во внеклеточном антигенсвязывающем домене. Повышение клинической эффективности и безопасности мультивалентных ВСМА CAR по данному изобретению было неожиданным.

Соответственно, в одном аспекте данного изобретения предлагается мультивалентный CAR, который содержит полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество однодоменных антител (sdAb), специфически связывающихся с ВСМА; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен.

В другом аспекте предлагается мультивалентный CAR, который содержит полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый ВСМА-связывающий фрагмент (такой как первое анти-ВСМА sdAb), специфически связывающееся с первым эпитопом ВСМА, и второй ВСМА-связывающий фрагмент (такой как второе анти-ВСМА sdAb), специфически связывающееся со вторым эпитопом ВСМА; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп отличается от второго эпитопа.

Кроме того, предлагаются новые анти-ВСМА sdAb и CAR, содержащие одно или большее количество из анти-ВСМА sdAb, описанных в данном документе.

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

I. Определения

Термин "антитело" включает моноклональные антитела (включая полноразмерные 4-цепочечные антитела или полноразмерные антитела только с тяжелой цепью, которые имеют Fc-область иммуноглобулина), композиции антител с полиэпитопической специфичностью, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, диатела и одноцепочечные молекулы), а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')₂ и Fv). В данном контексте термин "иммуноглобулин" (Ig) применяется взаимозаменяемо с термином "антитело". Антитела, рассматриваемые в данном документе, включают в себя однодоменные антитела, такие как антитела только с тяжелой цепью.

Основной единицей 4-цепочечного антитела является гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Антитело IgM состоит из 5 основных гетеротетрамерных единиц вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и содержит 10 антигенсвязывающих участков, тогда как антитела IgA состоят из 2-5 основных 4-цепочечных единиц, которые могут полимеризоваться с образованием поливалентных комплексов в комбинации с J-цепью. В случае IgG, 4-цепочечная единица обычно имеет массу 150000 Дальтон. Каждая L-цепь связана с H-цепью посредством одной ковалентной дисульфидной связи, тогда как две H-цепи связаны друг с другом посредством одной или большего количества дисульфидных связей в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также имеет расположенные с равными интервалами межцепочечные дисульфидные мостики. На N-конце каждая H-цепь имеет переменный домен (V_H), за которым следуют три константных домена (C_H) для каждой α- и γ-цепей и четыре C_H домена для μ- и ε-изоформ. На N-конце каждая L-цепь имеет переменный домен (V_L), за которым следует константный домен на ее другом конце. V_L выравнивается с V_H, а C_L выравнивается с первым константным доменом тяжелой цепи (C_{H1}). Предполагается, что конкретные аминокислотные остатки образуют область взаимодействия между переменными доменами легкой и тяжелой цепи. Спаривание V_H и V_L вместе образует антигенсвязывающий участок. Относительно структуры и свойств разных классов антител, см., например, Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I.

Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, стр. 71 и Глава 6. L-цепь из любого вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена своих тяжелых цепей (C_H), иммуноглобулины можно отнести к различным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющие тяжелые цепи, обозначенные соответственно α , δ , ϵ , γ и μ . Классы γ и α дополнительно разделяются на подклассы на основе относительно незначительных различий в последовательности C_H и функционирования, например, организм человека экспрессирует следующие подклассы: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Термин "антитело только с тяжелой цепью" или "HCAb" относится к функциональному антителу, которое содержит тяжелые цепи, но не содержит легких цепей, обычно встречающихся в 4-цепочечных антителах. Известно, что животные семейства верблюдовых (например, верблюды, ламы или альпаки) продуцируют HCAb.

Термин "однодоменное антитело" или "sdAb" относится к полипептиду, связывающему один антиген и имеющему три области, определяющие комплементарность (CDR). Антитело sdAb само способно связываться с антигеном без спаривания с соответствующим CDR-содержащим полипептидом. В некоторых случаях однодоменные антитела сконструированы из верблюжьих антител HCAb, а их переменные домены тяжелой цепи упоминаются в данном документе как " V_{HH} ". Некоторые V_{HH} также могут быть известны как нанотела. Верблюжье sdAb является одним из наименьших известных антигенсвязывающих фрагментов антител (см., например, Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-8 (1993); Greenberg et al., Nature 374: 168-73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh et al., Nanomedicine (Lond), 8: 1013-26 (2013)). Основной V_{HH} имеет следующую структуру от N-конца до C-конца: FR1-CDR1-FR2CDR2-FR3-CDR3-FR4, в котором FR1-FR4 относятся к каркасным областям с 1 по 4, и в котором CDR1-CDR3 относятся к областям 1-3, определяющим комплементарность.

"Выделенным" антителом является такое антитело, которое было идентифицировано, выделено и/или извлечено из компонента его продуцирующей среды (например, природное или рекомбинантное). Предпочтительно, выделенный полипептид не связан с какими-либо другими компонентами из его продуцирующей среды. Контаминирующие компоненты его продуцирующей среды, такие как рекомбинантные трансфицированные клетки, представляют собой вещества, которые, как правило,

препятствуют проведению исследования, диагностическому или терапевтическому применению антител и могут включать в себя ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения полипептид будет очищен: (1) более чем на 95 мас.% антитела, например, по методике Лоури, а в некоторых вариантах осуществления - более чем на 99 мас.%; (1) до степени, являющейся достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с помощью секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до получения гомогенности с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстановительных или невосстановительных условиях с применением, например, красителя Кумасси синего или, предпочтительно, серебряного. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один из компонентов природной среды антитела отсутствует. В то же время, выделенный полипептид или антитело, как правило, получают с применением по меньшей мере одного этапа очистки.

Термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" антитела относится к N-концевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи могут быть обозначены как " V_H " и " V_L ", соответственно. Как правило, эти домены являются наиболее вариабельными частями антитела (относительно других антител того же класса) и содержат антигенсвязывающие участки. Антитела только с тяжелой цепью, полученные от представителей видов верблюдовых, имеют одну вариабельную область тяжелой цепи, которая обозначается как " $V_{HН}$ ". Таким образом, $V_{HН}$ является особым типом V_H .

Термин "вариабельный" относится к тому факту, что среди антител некоторые сегменты вариабельных доменов сильно различаются по последовательностям. V-домен опосредует антигенное связывание и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. В то же время вариабельность не является равномерно распределенной по всему диапазону вариабельных доменов. Напротив, вариабельность сосредоточена в трех сегментах вариабельных доменов как легкой, так и тяжелой цепи, называемых гипервариабельными областями (HVR). Более консервативные фрагменты вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый вариабельный домен природных легких и тяжелых цепей содержит четыре FR-области, преимущественно принимающих конфигурацию бета-листа и соединенных тремя HVR, образующими петли, соединяющие структуры бета-типа, а в некоторых случаях являющиеся их частью. HVR каждой цепи объединены друг с другом в непосредственной

близости от FR-областей и, вместе с HVR другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего участка антитела (см. Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition*, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, однако проявляют различные эффекторные функции, например, участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности.

В данном контексте термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу однородных антител, т.е., из популяции, отдельные антитела в которой являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, поскольку они направлены на один антигенный участок. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают в себя разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено на одну детерминанту антигена. Кроме своей специфичности, преимущество препаратов моноклональных антител заключается в том, что они синтезированы гибридной культурой или рекомбинантно и не контаминированы другими иммуноглобулинами. Определение "моноклональное" указывает на характеристику антитела, полученного по существу из однородной популяции антител, и не должно быть истолковано как необходимость получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, которые будут применяться согласно данному изобретению, можно получить различными способами, включая, например, гибридную технологию (например, Kohler and Milstein., *Nature*, 256: 495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)), технологии рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567), технологии фагового дисплея (см., например, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); и Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), и технологии продукции антител человека или аналогов антител человека в организмах животных, частично или полностью содержащих локусы или гены иммуноглобулинов человека, кодирующие последовательности иммуноглобулинов человека (см., например,

WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7: 33 (1993); патенты США №№. 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; и 5661016; Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); и Lonberg и Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

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

Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" или "целое антитело" в данном документе являются взаимозаменяемыми и относятся к антителу по существу в его интактной форме, в отличие от фрагмента антитела. В частности, полноразмерные 4цепочечные антитела включают в себя такие антитела, которые имеют тяжелую и легкую цепи, включая Fc-область. Полноразмерные антитела только с тяжелой цепью включают в себя тяжелую цепь (такую как V_HH) и Fc-область. Константные домены могут быть константными доменами нативных последовательностей (например, константные домены нативных последовательностей человека) или их вариантами аминокислотных последовательностей. В некоторых случаях интактное антитело может иметь одну или большее количество эффекторных функций.

"Фрагмент антитела" содержит часть интактного антитела, предпочтительно антигенсвязывающий и/или переменный участок интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают Fab-, Fab'-, F(ab')₂ и Fv-фрагменты; диатела; линейные антитела (см. патент США № 5641870, Пример 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 10571062 [1995]); молекулы одноцепочечных антител; однодоменные антитела (такие как V_HH) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. При расщеплении антител папином образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемые "Fab"-фрагментами, и остаточный "Fc"-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Fab-фрагмент состоит из целой L-цепи вместе с доменом переменной области H-цепи (V_H), и первым константным доменом из одной тяжелой цепи (C_{H1}). Каждый Fab-фрагмент является моновалентным относительно связывания антигена, т. е., он имеет один антигенсвязывающий участок. Обработка антитела пепсином позволяет получить один большой F(ab')₂-фрагмент, который условно соответствует двум дисульфидносвязанным Fab-фрагментам, имеющим различную антигенсвязывающую активность и по-прежнему способным к перекрестному связыванию

антигена. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов тем, что имеют несколько дополнительных остатков на карбоксильном конце домена C_H1, включая в себя один или большее количество цистеинов из шарнирного участка антитела. В данном описании Fab'-SH представляет собой обозначение Fab', в котором цистеиновый(е) остаток(и) константных доменов несет (несут) свободную тиольную группу. F(ab')₂-фрагменты антитела первоначально получали в виде пар Fab'-фрагментов, между которыми находятся шарнирные остатки цистеина. Известны также другие варианты химического связывания фрагментов антител.

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

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, содержащий полный антигенраспознающий и антигенсвязывающий участок. Этот фрагмент состоит из димера одного домена переменной области тяжелой цепи и одного домена переменной области легкой цепи, соединенных жесткой нековалентной связью. В результате фолдинга этих двух доменов получаются шесть гиперпеременных петель (по 3 петли из H и Lцепи), которые вносят аминокислотные остатки для связывания антигена и придают антигенсвязывающую специфичность к антителу. В то же время даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфических по отношению к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем полный участок связывания.

"Одноцепочечные Fv», также имеющие аббревиатуру "sFv" или "scFv", представляют собой фрагменты антител, которые содержат домены антител V_H и V_L, связанные в одну полипептидную цепь. Предпочтительно, полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, которые дают возможность scFv образовывать требуемую структуру для связывания антигенов. Для обзора sFv, см. публикацию Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

"Функциональные фрагменты" описанных в данном документе антител содержат часть интактного антитела, обычно включающую антигенсвязывающую или переменную область интактного антитела или Fc-область антитела, которая сохраняет или модифицирует способность связывания FcR. Примеры фрагментов антител включают

в себя линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

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

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

"Гуманизованные" формы антител нечеловеческого происхождения (например, верблюда) представляют собой химерные антитела, содержащие минимальные последовательности, являющиеся производными от иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения гуманизованное антитело представляет собой иммуноглобулин человека (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR реципиента (в дальнейшем описанные) заменяют остатками из HVR вида нечеловеческого происхождения (донорное антитело), например, мыши, крысы, кролика или примата, не являющегося человеком, обладающий желательной специфичностью, аффинностью и/или активностью. В некоторых случаях

каркасные ("FR") остатки иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, отсутствующие в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации можно осуществить для дальнейшего уточнения характеристик антител, таких как аффинность связывания. Как правило, гуманизированное антитело содержит по существу все или по меньшей мере один, а обычно два переменных домена, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют гипервариабельным петлям последовательности иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все FR-области представляют собой такие области, которые относятся к последовательности иммуноглобулина человека, тем не менее FR-области могут включать в себя одну или большее количество замен отдельных FR-остатков, что улучшает характеристики антител, такие как аффинность связывания, изомеризация, иммуногенность и т. д. Количество этих аминокислотных замен в FR обычно не превышает 6 в H-цепи, а в L-цепи - не более 3. Гуманизированное антитело, необязательно, также содержит по меньшей мере участок константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Дополнительную информацию см., например, в публикациях Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992). Кроме того, см., например, Vaswani и Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1: 105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035-1038 (1995); Hurler и Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5: 428-433 (1994); и патенты США №№ 6982321 и 7087409.

"Антитело человека" представляет собой антитело, обладающее аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности антитела, продуцированного в организме человека и/или полученного с помощью любой методики получения антител человека, описанных в данном документе. Это определение антитела человека, в частности, не включает гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки нечеловеческого происхождения. Антитела человека можно получить с помощью различных методик, известных в данной области техники, включая библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom и Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991). Также доступными для получения моноклональных антител человека являются способы, описанные в Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991). См. также van Dijk и van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Антитела человека можно получить путем

введения антигена в организм трансгенного животного, модифицированного с целью продукции таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но при этом эндогенные локусы указанного животного отключены, например, иммунизированных ксеномышей (см., например, патенты США №№ 6075181 и 6150584 о технологии XENOMOUSE™). Информацию об антителах человека, полученных посредством технологии В-клеточных гибридом человека, см., например, в публикации Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557-3562 (2006)

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

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

Ряд описаний HVR применяется и охватывается в данном документе. Определение "областей, определяющих комплементарность (CDR)" по Кэботу, основано на изменчивости последовательности и применяется наиболее часто (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Чотиа вместо этого указывает на расположение структурных петель (Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). AbM HVR представляют собой компромисс между CDR по Кэботу и структурными петлями по Чотиа и применяются в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. "Контактные" HVR основаны на анализе доступных сложных кристаллических структур. Остатки из каждой из этих HVR отмечены ниже в Таблице 1.

Таблица 1. Определения HVR.

Петля	Кэбот	AbM	Чотиа	Контакт
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55

L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Нумерация по Кэботу)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Нумерация по Чотиа)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

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

Аминокислотные остатки sdAb (такие как V_{HH}) нумеруются согласно общей нумерации для доменов V_H по Kabat et al. (“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services, NIH Bethesda, Md., Publication No. 91), применительно к доменам V_{HH} , полученным от представителей семейства верблюдовых в статье Riechmann и Muyldermans, J. Immunol. Methods 2000 Jun. 23; 240 (1-2): 185-195. Согласно этой нумерации FR1 V_{HH} содержит аминокислотные остатки в положениях 1-30, CDR1 V_{HH} содержит аминокислотные остатки в положениях 31-35, FR2 V_{HH} содержит аминокислотные остатки в положениях 36-49, CDR2 V_{HH} содержит аминокислотные остатки в положениях 50-65, FR3 V_{HH} содержит аминокислотные остатки в положениях 66-94, CDR3 V_{HH} содержит аминокислотные остатки в положениях 95-102 и FR4 V_{HH} содержит аминокислотные остатки в положениях 103-113. В этом отношении следует отметить, что, как хорошо известно в данной области техники для доменов V_H и для доменов V_{HH} , общее количество аминокислотных остатков в каждой из CDR может варьироваться и может не соответствовать общему количеству аминокислотных остатков, обозначенных согласно нумерации Kabat (то есть, одно или большее количество положений согласно нумерации Kabat не обязательно могут быть заняты в конкретной последовательности, или конкретная последовательность может содержать больше аминокислотных остатков, чем количество, допустимое нумерацией Kabat).

Выражения “нумерация остатков переменного домена по Kabat” или “нумерация положений аминокислот по Kabat” и их варианты относятся к системе нумерации,

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

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

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

"Человеческий консенсусный каркас" или "человеческий акцепторный каркас" является структурой, которая представляет собой наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в отборе каркасных последовательностей V_L или V_H иммуноглобулина человека. Как правило, отбор последовательностей V_L или V_H иммуноглобулина человека осуществляют из подгруппы последовательностей переменного домена. Как правило, подгруппа последовательностей является

подгруппой, как в описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed

. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). В случае V_L , примеры включают в себя подгруппу, которая может быть подгруппой каппа I, каппа II, каппа III или каппа IV, как описано в Kabat et al., выше. Кроме того, в случае V_H , подгруппа может быть подгруппой I, подгруппой II или подгруппой III, как описано в Kabat et al. В альтернативном варианте, человеческий консенсусный каркас может быть производным от вышеописанных конкретных остатков, например, когда человеческий каркасный остаток выбирают на основе его гомологии с донорским каркасом путем выравнивания последовательности донорского каркаса с набором различных последовательностей человеческого каркаса. Акцепторный человеческий каркас, "производный от" каркаса иммуноглобулина человека или человеческого консенсусного каркаса, может иметь такую же аминокислотную последовательность или может

содержать ранее существовавшие изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения количество ранее существовавших аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее, или 2 или менее.

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

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

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

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

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

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

"Эффекторные функции антитела" относятся к биологическим видам активности, присущим Fc-области (Fc-область с нативной последовательностью или вариант аминокислотной последовательности Fc-области) антитела, и изменяются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают в себя: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность; связывание с рецептором Fc;

антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; снижение уровня экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, рецепторов В-клетки) и активацию В-клетки. "Сниженная или минимизированная" эффекторная функция антитела означает, что функция снижена по меньшей мере на 50 % (в альтернативном варианте на 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) по сравнению с антителом дикого типа или немодифицированным антителом. Эффекторную функцию антитела легко может определить и измерить обычный специалист в данной области техники. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения воздействуют на эффекторные функции антитела относительно связывания комплемента, функции комплемент-зависимой цитотоксичности и антителозависимой цитотоксичности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторная функция устраняется посредством мутации в константной области, которая устраняет гликозилирование, например, "мутация без эффектора". В одном аспекте мутация без эффектора представляет собой мутацию N297A или DANA (D265A + N297A) в области C_H2. Shields et al., J. Biol. Chem. 276 (9): 6591-6604 (2001). В альтернативном варианте дополнительные мутации, приводящие к уменьшению или устранению эффекторной функции, включают в себя: K322A и L234A/L235A (LALA). В альтернативном варианте эффекторную функцию можно уменьшить или устранить с помощью методов продуцирования, таких как экспрессия в клетках-хозяевах, которая при отсутствии гликозилирования (например, E. coli.) или в результате измененного профиля гликозилирования является неэффективной или менее эффективной при повышении эффекторной функции (например, Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278 (5): 3466-3473 (2003).

"Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или АЗКЦ относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig связывается с Fcрецепторами (FcR), присутствующими на некоторых цитотоксических клетках (например, клетки естественные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), позволяя этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с антигенсодержащей клеткой-мишенью и впоследствии уничтожать клетку-мишень цитотоксинами. Антитела "вооружают" цитотоксические клетки и необходимы для уничтожения клетки-мишени с помощью этого механизма. Первичные клетки для опосредования АЗКЦ, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Сводная информация об экспрессии FcR на гемопоэтических клетках приведена в Таблице 3 на странице 464 публикации Ravetch и Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). Для оценки активности АЗКЦ молекулы, представляющей интерес, можно

провести анализ АЗКЦ *in vitro*, такой как описанный в патенте США № 5500362 или 5821337. В качестве эффекторных клеток в таких анализах можно применять мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и клетки-натуральные киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте активность АЗКЦ молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, на модели животного, такой как описано в публикации Clynes et al., PNAS USA 95: 652-656 (1998).

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

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

Конкретные иллюстративные и типовые варианты осуществления данного изобретения, связанные с измерением аффинности связывания, описаны в данном документе.

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

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

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

"двухэпитопный CAR" относится к CAR, имеющему внеклеточный связывающий домен, специфичный для двух разных эпитопов на ВСМА.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR или sdAb, описанные в данном документе, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая является идентифицированной и отделена по меньшей мере от одной контаминирующей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в среде, являющейся средой ее продуцирования. Предпочтительно, выделенная нуклеиновая кислота не связана со всеми компонентами, связанными со средой продуцирования. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды и антитела, описанные в данном документе, находятся в форме, отличающейся от формы или компоновки, в которой она встречается в природе. Таким образом, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты отличаются от нуклеиновой кислоты, существующей в природных условиях в клетках, и кодирующей полипептиды и антитела, описанные в данном документе.

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

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

подходящей методикой применяются синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры.

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

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

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

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

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

Термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" в данном документе применяются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают в себя "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают в себя первично трансформированные клетки и полученное из них потомство, независимо

от числа пассажиров. Потомство может не быть полностью идентичным родительской клетке по содержанию нуклеиновых кислот и может содержать мутации. В объем данного описания входит мутантное потомство, полученное путем скрининга или отбора, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, как и исходно трансформированная клетка.

В данном контексте термин "лечение" или "воздействие" представляет собой подход для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты. Для целей данного изобретения полезные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, одно или большее количество из следующих состояний: облегчение одного или большего количества симптомов, вызванных заболеванием, уменьшение степени тяжести заболевания, стабилизация заболевания (например, предотвращение или замедление ухудшения заболевания), предотвращение или замедление распространения (например, метастазирования) заболевания, предотвращение или замедление развития рецидива заболевания, замедление или задержку прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности заболевания, достижение ремиссии (частичной или полной) заболевания, уменьшение дозы одного или большего количества других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, задержку прогрессирования заболевания, повышения качества жизни и/или продление выживания. Термин "лечение" также относится к снижению выраженности патологических последствий рака. Способы по данному изобретению предполагают один или большее количество из этих аспектов лечения.

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

В данном контексте термин "эффективное количество" относится к количеству агента, такого как sdAb, сконструированной иммунной эффекторной клетки или их фармацевтической композиции, достаточному для лечения определенного нарушения, патологического состояния или заболевания, например, достигая улучшения, ослабления, уменьшения интенсивности и/или задержки развития одного или большего количества симптомов. В отношении рака, эффективное количество включает количество, достаточное для того, чтобы вызвать сокращение объема опухоли и/или уменьшить скорость роста опухоли (например, для подавления роста опухоли) или предотвратить или задержать другую нежелательную пролиферацию клеток. В некоторых вариантах

осуществления данного изобретения эффективное количество представляет собой количество, достаточное для задержки развития. В некоторых вариантах реализации эффективное количество представляет собой количество, достаточное для предупреждения или задержки развития рецидива. Эффективное количество может быть введено за одно или большее количество введений. Эффективное количество лекарственного средства или композиции может: (i) снижать количество раковых клеток; (ii) уменьшать размер опухоли; (iii) ингибировать, задерживать, замедлять до некоторой степени и, предпочтительно, останавливать инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) ингибировать (то есть, замедлять до некоторой степени и, предпочтительно, останавливать) метастазирование опухоли; (v) ингибировать рост опухоли; (vi) предупреждать или задерживать возникновение и/или развитие рецидива опухоли; и/или (vii) облегчать до некоторой степени один или большее количество симптомов, ассоциированных с раком.

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

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

В данном контексте термин "задержка" развития рака означает откладывание, препятствование, замедление, стабилизацию и/или отсрочку развития заболевания. Эта задержка может быть разной продолжительности времени, в зависимости от анамнеза заболевания и/или индивидуума, который получает лечение. Как очевидно специалисту в данной области техники, достаточная или значительная задержка может, по сути, включать в себя предотвращение, поскольку заболевание у индивидуума не развивается. Способ, который "задерживает" развитие рака представляет собой способ, который уменьшает вероятность развития заболевания в данном временном интервале и/или уменьшает степень заболевания в данном временном интервале по сравнению с неприменением способа. Как правило, такие сравнения основываются на клинических

исследованиях с включением статистически значимого числа индивидуумов. Развитие рака можно обнаружить с помощью стандартных методов, включая, но не ограничиваясь ими, компьютерную аксиальную томографию (САТ скан), магнитно-резонансную томографию (МРТ), ультразвуковое исследование органов брюшной полости, тесты на свертывание крови, ангиографию или биопсию. Развитие может также относиться к прогрессированию рака, который может быть первоначально необнаруживаемым, и включает возникновение, рецидив и первые проявления.

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

В данном контексте термин "носители" включают в себя фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, которые нетоксичны для клетки или млекопитающих, подвергающихся их воздействию при применяемых дозах и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный рН-буферизирующий раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают в себя буферные вещества, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензэтония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и m-крезол); низкомолекулярные (содержащие менее 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, например, поливинилпирролидон; аминокислоты, например, глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлсодержащие комплексы (например, комплексы Zn-белок) и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (ПЭГ), а также PLURONIC™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

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

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

"Стабильный" состав представляет собой состав, в котором белок по существу сохраняет свою физическую и химическую стабильность и целостность при хранении. Различные аналитические методы для измерения стабильности белка доступны в данной области техники и рассматриваются в публикации Peptide and Protein Drug Delivery, 247301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Pubs. (1991) и Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). Стабильность можно измерить при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Для быстрого скрининга состав можно выдержать при 40 °C в течение периода времени от 2 недель до 1 месяца, после чего измерить стабильность. Если состав хранится при температуре 2-8 °C, как правило, он должен быть стабильным при температуре 30 °C или 40 °C в течение по меньшей мере 1 месяца и/или должен быть стабильным при температуре 2-8° C в течение по меньшей мере 2 лет. Если состав хранится при температуре 30 °C, как правило, он должен быть стабильным в течение по меньшей мере 2 лет при температуре 30°C и/или должен быть стабильным при температуре 40 °C в течение по меньшей мере 6 месяцев. Например,

степень агрегации во время хранения может использоваться в качестве индикатора стабильности белка. Таким образом, "стабильный" состав может быть таким, в котором менее 10 %, а предпочтительно менее 5 % белка присутствуют в форме единого скопления в составе. В других вариантах осуществления данного изобретения можно определить любую степень увеличения скопления при хранении состава.

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

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

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

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

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

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

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

II. Однодоменные антитела анти-BCMA

В одном аспекте данного изобретения предлагаются выделенные однодоменные антитела (называемые в данном документе "анти-BCMA sdAb"), которые специфически связываются с BCMA, таким как BCMA человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb модулирует активность BCMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является антагонистическим антителом. Кроме того, предлагаются антигенсвязывающие фрагменты, производные от любого из описанных в данном документе анти-BCMA sdAb, и антигенсвязывающие белки, содержащие любое из описанных в данном документе анти-BCMA sdAb. Типовые анти-BCMA sdAb приведены в Таблице 2 ниже.

Таблица 2. Типовые анти-BCMA sdAb.

sdAb	Тип. AK SEQ ID	Тип. HK SEQ ID	CDR1	CDR2	CDR3
269A 3734 6	115	153	DYYAIG (SEQ ID NO: 1)	CISRSDGSTYYADSVK G (SEQ ID NO: 39)	AGADCSGYLRDY EF (SEQ ID NO: 77)
269A 3734 8	116	154	TYGMA (SEQ ID NO: 2)	SKASMNYSGRTYYAD SVKG (SEQ ID NO: 40)	AGTGCSTYGCFDA QIIDY (SEQ ID NO: 78)
269A 3791 7	117	155	TFTMG (SEQ ID NO: 3)	AISLSPTLAYYAESVK G (SEQ ID NO: 41)	ADRKSVMSIRPDY (SEQ ID NO: 79)
269A 3735 5	118	156	INAMG (SEQ ID NO: 4)	SIRGLGRTNYDDSVK G (SEQ ID NO: 42)	VYVTLLGGVNRD Y (SEQ ID NO: 80)
269A 3791 5	119	157	SIVMG (SEQ ID NO: 5)	AIMWNDGITYLQDSV KG (SEQ ID NO: 43)	ASKGRYSEYEY (SEQ ID NO: 81)

269A 3793 6	120	158	RAVIV (SEQ ID NO: 6)	FIKPSDGTIYYIDSLKG (SEQ ID NO: 44)	ASPEDWYTDWID WSIYR (SEQ ID NO: 82)
269A 3795 3	121	159	SDVMG (SEQ ID NO: 7)	AIMWNDGITYLQDSV KG (SEQ ID NO: 45)	ASKGRYSEY (SEQ ID NO: 83)
269A 3796	122	160	NDHMA (SEQ ID NO: 8)	AIDWSGRTTNYADPV EG (SEQ ID NO: 46)	VLRAWISYDNDY (SEQ ID NO: 84)

5					
269A 3797 2	123	161	KNTVA (SEQ ID NO: 9)	SITWDGRTTYADSV KG (SEQ ID NO: 47)	DLGKWPAGPADY (SEQ ID NO: 85)
269A 3735 3	124	162	SHVMG (SEQ ID NO: 10)	VIGWRDISTSYADSVK G (SEQ ID NO: 48)	ARRIDAADFDS (SEQ ID NO: 86)
269A 3794 8	125	163	TYFMA (SEQ ID NO: 11)	GIAWSSGGSTAYADSV KG (SEQ ID NO: 49)	SRGIEVEEFGA (SEQ ID NO: 87)
269B 005	126	164	INVMA (SEQ ID NO: 12)	AVTRDGRKSCGDSVK G (SEQ ID NO: 50)	DGWGATTLDYTY GMDY (SEQ ID NO: 88)
269B 023	127	165	TFTMG (SEQ ID NO: 13)	SITWDGRSAYYAESV KG (SEQ ID NO: 51)	DRKSVMSIRPDY (SEQ ID NO: 89)
269B 024	128	166	INAMG (SEQ ID NO: 14)	TITRGGSTNYGPSVKG (SEQ ID NO: 52)	ERLDGSGYGYEYD Y (SEQ ID NO: 90)
269B 028	129	167	KNTVA (SEQ ID NO: 15)	SITCDGRTTYANSV NG (SEQ ID NO: 53)	YRKSIMSIQPDY (SEQ ID NO: 91)
269B 030	130	168	SIVMG (SEQ ID NO: 16)	AIMWNDGLTYLQGSV KG (SEQ ID NO: 54)	DRKSVMSIRPDY (SEQ ID NO: 92)

269B 038	131	169	TFTMG (SEQ ID NO: 17)	AISLSPTLAYYAESVK G (SEQ ID NO: 55)	RRIDAADFDS (SEQ ID NO: 93)
269B 054	132	170	KNTVA (SEQ ID NO: 18)	SITWDGRRTYYADSV KG (SEQ ID NO: 56)	LGKWPAGPADY (SEQ ID NO: 94)
269B 059	133	171	INTMD (SEQ ID NO: 19)	AISLSPTLAYYAESVK G (SEQ ID NO: 57)	DRKSVMSIRPDY (SEQ ID NO: 95)
269B 060	134	172	KNTVA (SEQ ID NO: 20)	SITCDGRRTYYANSV KG (SEQ ID NO: 58)	LGKWPAGSADY (SEQ ID NO: 96)

269B 069	135	173	DYWMH (SEQ ID NO: 21)	SIDTSGQTTYADSLK G (SEQ ID NO: 59)	RYRGGTWYGMAN (SEQ ID NO: 97)
269B 074	136	174	SNTMA (SEQ ID NO: 22)	STTWNGRSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 60)	LGKWPAGPADY (SEQ ID NO: 98)
269B 076	137	175	TFTMG (SEQ ID NO: 23)	DISGGRTNYADSVKG (SEQ ID NO: 61)	DRKSVMSIRPDY (SEQ ID NO: 99)
269B 079	138	176	VAAISL (SEQ ID NO: 24)	FTISRDNKNTVVLQ MNSLKP (SEQ ID NO: 62)	DRKSVMSIRPDY (SEQ ID NO: 100)
269B 083	139	177	KNTVA (SEQ ID NO: 25)	SITWDGRRTYYADSV KG (SEQ ID NO: 63)	TASCHLFLGLGSGA FVS (SEQ ID NO: 101)
269B 085	140	178	TFTMG (SEQ ID NO: 26)	AISLSPTLAYYAESVK G (SEQ ID NO: 64)	SKDRYSEYEY (SEQ ID NO: 102)
269B 093	141	179	TFTMG (SEQ ID NO: 27)	AISLSPTLAYYAESVK GKG (SEQ ID NO: 65)	KNGGPVDY (SEQ ID NO: 103)
269B 094	142	180	SIVMG (SEQ ID NO: 28)	AIMWNDGITYLQDSV KG (SEQ ID NO: 66)	SKGRYSEYEY (SEQ ID NO: 104)

269B 104	143	181	TFTMG (SEQ ID NO: 29)	AINLSPTLTYAESVK G (SEQ ID NO: 67)	ERKSVMAIPPDY (SEQ ID NO: 105)
269B 109	144	182	TFTMG (SEQ ID NO: 30)	SITLIPTFPYYAHSVKG (SEQ ID NO: 68)	YRKYLM SILPDY (SEQ ID NO: 106)
269B 110	145	183	TFTMG (SEQ ID NO: 31)	AISLSPTLAYYAESVK G (SEQ ID NO: 69)	NRNSQRVIAALSW IGMNY (SEQ ID NO: 107)
269B 113	146	184	TFTMG (SEQ ID NO: 32)	AISLSPTLAYYAESVK G (SEQ ID NO: 70)	RRIDAADFDS (SEQ ID NO: 108)
269B 126	147	185	TFTMG (SEQ ID NO: 33)	VIGWRDINASYADSV KG (SEQ ID NO: 71)	RRIDATDFDS (SEQ ID NO: 109)
269B 129	148	186	NHVMG (SEQ ID NO: 34)	VIGWRDISTSYADSVK G (SEQ ID NO: 72)	RRIDAADFDS (SEQ ID NO: 110)
269B 131	149	187	NYILA (SEQ ID NO: 35)	HISRSGGKSGYGDSV KG (SEQ ID NO: 73)	PLWYGSPTLIDY (SEQ ID NO: 111)
269B 135	150	188	TFTMG (SEQ ID NO: 36)	AISLSPTLAYYAESVK G (SEQ ID NO: 74)	DRKSVMSIRPDY (SEQ ID NO: 112)
269B 136	151	189	TFTMG (SEQ ID NO: 37)	AISLSPTLAYYAEPVK G (SEQ ID NO: 75)	DRKSVMSIRPDY (SEQ ID NO: 113)
269B 139	152	190	NNFVMG (SEQ ID NO: 38)	AISLSPTLAYYVESVK G (SEQ ID NO: 76)	DRKSVMSIRPDY (SEQ ID NO: 114)

В-клеточный зрелый антиген (BCMA), также известный как CD269, является представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей, а именно TNFRSF17 (Thompson et al., J. Exp. Medicine, 192 (1): 129-135, 2000). BCMA человека практически исключительно экспрессируется в клетках плазмы и клетках множественной миеломы (см., например, Novak et al., Blood, 103(2): 689-694, 2004; Neri et al., Clinical Cancer Research, 73(19): 5903-5909; Felix et al., Mol. Oncology, 9(7): 1348-58, 2015). BCMA может связывать активирующий фактор В-клеток (BAFF) и лиганд, индуцирующий

пролиферацию (APRIL) (например, Mackay et al., 2003 and Kalled et al., Immunological Review, 204: 43-54, 2005). BCMA может быть подходящей опухолевой антигенной мишенью для иммунотерапевтических агентов при лечении множественной миеломы. Антитела с высокой аффинностью могут блокировать связывание между BCMA и его нативными лигандами BAFF и APRIL. Анти-BCMA sdAb можно применять в комбинации с клеточной иммунотерапией CAR-T-клетками, например, для усиления цитотоксических эффектов, направленных против опухолевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антиBCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 118. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антиBCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 120. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 121. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 122. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 123. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антиBCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 125. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 126. В некоторых вариантах

две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 142. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 143. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 144. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 145. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 148. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 150. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 151. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 152. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблюжьим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит акцепторный человеческий каркас, например, каркас человеческого иммуноглобулина или человеческий консенсусный каркас.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, содержащее по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три CDR, выбранные из (a) CDR1, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-38; (b) CDR2, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 39-76; и (c) CDR3, содержащей

аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 77-114. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблужьим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит акцепторный человеческий каркас, например, каркас человеческого иммуноглобулина или человеческий консенсусный каркас.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, которое содержит три CDR, содержащие: а) CDR1, характеризующуюся по меньшей мере около 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96%, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1-38; (b) CDR2, характеризующуюся по меньшей мере около 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96%, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 39-76; и (c) CDR3, характеризующуюся по меньшей мере около 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 77-114. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CDR, характеризующаяся по меньшей мере около 85%, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99% идентичностью, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но анти-BCMA sdAb, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с BCMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, которое содержит три CDR, содержащие: (a) CDR1, имеющую по меньшей мере около 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен (например, консервативных замен), вставок или делеций в аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-38; (b) CDR2, имеющую по меньшей мере около 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен (например, консервативных замен), вставок или делеций в аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 39-76; и (c) CDR3, имеющую по меньшей мере около 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замен (например, консервативных замен), вставок или делеций в аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 77-114. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb характеризуется созревшей аффинностью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблужьим. В некоторых вариантах осуществления данного

изобретения анти-BCMA sdAb является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит акцепторный человеческий каркас, например, каркас человеческого иммуноглобулина или человеческий консенсусный каркас.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антиBCMA sdAb, которое содержит три CDR, содержащие: (a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; (b) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и (c) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, которое содержит три CDR, содержащие: (a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (b) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и (c) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, которое содержит три CDR, содержащие: (a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; (b) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; и (c) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, которое содержит три CDR, содержащие: (a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (b) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; и (c) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, которое содержит три CDR, содержащие: (a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; (b) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; и (c) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, которое содержит три CDR, содержащие: (a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; (b) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; и (c) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, которое содержит три CDR, содержащие: (a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; (b) CDR2, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается анти-BCMA sdAb, которое содержит три CDR, содержащие: (a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; (b) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; и (c) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблюжьим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит акцепторный человеческий каркас, например, каркас человеческого иммуноглобулина или человеческий консенсусный каркас.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, анти-BCMA sdAb, включая любой из вариантов осуществления, описанных выше (то есть, анти-BCMA sdAb, содержащее специфическую CDR1, CDR2 и/или CDR3), содержит домен $V_{H}H$, характеризующийся по меньшей мере около 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92%, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 115-152. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения $V_{H}H$, характеризующийся по меньшей мере около 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92%, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичностью, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но анти-BCMA sdAb, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с BCMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в общей сложности от 1 до 10 аминокислот заменены, вставлены и/или удалены в аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 115-152. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения замены, вставки или делеции встречаются в областях, находящихся за пределами CDR (т.е., в FR). Необязательно анти-BCMA sdAb содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 115-152, включая в себя посттрансляционные модификации этой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенное анти-BCMA sdAb, содержащее домен $V_{H}H$, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115-152. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115-152.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения функциональные эпитопы могут быть картированы с помощью комбинаторного аланинового сканирования. В этом процессе стратегию комбинаторного аланинового сканирования можно применять для идентификации аминокислот в белке ВСМА, которые необходимы для взаимодействия с анти-ВСМА sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эпитоп представляет собой конформационную и кристаллическую структуру анти-ВСМА sdAb, связанного с ВСМА, которое можно применять для идентификации эпитопов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается эпитоп ВСМА, производный от аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 388-394. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается эпитоп ВСМА, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 388-394.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются антитела, которые конкурируют с любым из анти-ВСМА sdAb, описанным в данном документе, за связывание с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются антитела, которые конкурируют с анти-ВСМА sdAb, описанным в данном документе, за связывания с эпитопом на ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и анти-ВСМА sdAb, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115-152. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое специфически связывается с ВСМА конкурентно с анти-ВСМА sdAb, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115-152.

В некоторых вариантах реализации изобретения анализы конкуренции могут применяться для идентификации моноклонального антитела, которое конкурирует с анти-ВСМА sdAb, описанным в данном документе, за связывания с ВСМА. Анализы конкуренции могут применяться для определения того, связывают ли два антитела один и тот же эпитоп, распознавая идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы, или одно антитело конкурентно ингибирует связывание другого антитела с антигеном. В определенных вариантах реализации данного изобретения такое конкурирующее антитело связывается с одним и тем же эпитопом (например, эпитопом ВСМА, производным от аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 388-394), который связывается описанным в данном документе антителом. Типовые

анализы конкуренции включают, но не ограничиваются ими, обычные анализы, например, описанные в Harlow и Lane (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.). Подробное описание иллюстративных способов картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлено в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," в *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, N.J.). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения два антитела, как сообщается, связываются с одним и тем же эпитопом, если каждый блок связывает другой на 50 % или более. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, которое конкурирует с описанным в данном документе анти-BCMA sdAb, представляет собой верблюжье, химерное, гуманизованное или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело, которое конкурирует с верблюжьим, химерным, гуманизованным или человеческим анти-BCMA sdAb, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается антитело анти-BCMA или антигенсвязывающий белок, содержащий любое из анти-BCMA sdAb, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-BCMA представляет собой моноклональное антитело, включая верблюжье, химерное, гуманизованное или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-BCMA представляет собой фрагмент антитела, например, фрагмент V_HH. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело анти-BCMA представляет собой полноразмерное антитело только с тяжелой цепью, содержащее Fc-область любого класса или изотипа антител, такого как IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Fc-область характеризуется ослабленной или минимизированной эффекторной функцией.

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любое из антител анти-BCMA (таких как анти-BCMA sdAb), описанных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая анти-BCMA sdAb, при этом нуклеиновая кислота содержит последовательность, характеризующуюся

по меньшей мере около 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 153-190. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 153-190. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор (например, экспрессионный вектор), содержащий такую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ получения антитела анти-BCMA, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело анти-BCMA, как описано выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела анти-BCMA, и, необязательно, извлечение антитела анти-BCMA из клетки-хозяина (или среды, в которой культивируют клетку-хозяина).

Характеристики антител

1. Аффинность антител

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения K_d измеряют с помощью анализа связывания антигена, меченного радиоактивным изотопом (RIA), с применением Fab-версии или фрагмента V_{HH} представляющего интерес антитела и его антигена, как описано в следующем анализе. Например, аффинность связывания Fab с антигеном в растворе измеряют путем уравнивания Fab с минимальной концентрацией (^{125}I)-меченого антигена в присутствии серии разведений немеченого антигена немеченого антигена с последующим захватом связанного антигена на планшете, покрытом антителом анти-Fab (см., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881(1999)).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения K_d измеряют с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса с использованием

BIACORE[®]-2000 или BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Пискатауэй, штат Нью-Джерси) при 25 °С с чипами CM5, иммобилизованными антигеном при примерно 10 единицах ответа (RU). Вкратце, чипы биосенсора с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIAcore, Inc.) активировали N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимидгидрохлоридом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антиген разбавляли 10 мМ раствором ацетата натрия, pH 4.8, до 5 мкг/мл (приблизительно 0,2 мкМ) и вводили при скорости потока 5 мкл/минуту, достигая около 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После введения антигена вводили 1 М раствор этаноламина для блокирования непрореагировавших групп. Для измерения кинетики вводят двукратные серийные разведения Fab или V_HH антитела, представляющего интерес (от 0,78 нМ до 500 нМ) вводят в ФСБ с 0,05% поверхностноактивным веществом полисорбатом-20 (TWEEN-20TM) (PBST), при 25°С при скорости потока приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации

(k_{off}) рассчитывали с помощью простой взаимно-однозначной модели связывания Ленгмюра (программное обеспечение (BIACORE[®] Evaluation, версия 3.2) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (K_d) рассчитывали как соотношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999). Если скорость ассоциации согласно вышеописанному анализу поверхностного плазмонного резонанса превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, то ее можно определить с помощью методики гашения флуоресценции, измеряющей увеличение или снижение интенсивности испускания флуоресценции (возбуждение равно 295 нм; испускание равно 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25 °С для 20 нМ раствора антител против антигена (в форме Fab) в PBS, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, измеренных на спектрометре, например, на спектрофотометре с устройством остановки потока (Aviv Instruments) или спектрофотометре SLM-AMINCOTM 8000 серии (ThermoSpectronic) с перемешиваемой кюветой.

2. Фрагменты антител

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложенное в данном описании антитело представляет собой фрагмент антитела. Фрагменты антител включают в себя, но не ограничиваются перечисленным, фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH,

$F(ab')_2$, Fv и scFv, $V_{\text{H}}\text{H}$, а также другие фрагменты, описанные ниже. Обзор некоторых фрагментов антител см. в статье Hudson et al. *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003). Обзор фрагментов scFv см., например, в работе Pluckthün, в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); см. также WO 93/16185; и патенты США №№ 5571894 и 5587458. Описание фрагментов Fab- и $F(ab')_2$, содержащих остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации, и характеризующихся увеличенным периодом полувыведения *in vivo*, см. в патенте США № 5869046.

Диатела представляют собой фрагменты антител, содержащие два антигенсвязывающих участка, и могут быть двухвалентными или биспецифическими. См., например, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003); и Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Триатела и тетратела также описаны в публикации Hudson et al., *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003).

Фрагменты антител могут быть получены различными методами, включая, но не ограничиваясь этим, в результате протеолитического расщепления интактного антитела, а также продукции рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фагов), как описано в данном документе.

3. Химерные и гуманизированные антитела

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения химерное антитело является гуманизированным антителом. Как правило, антитело нечеловеческого происхождения гуманизируют с целью снижения иммуногенности для людей, сохраняя при этом специфичность и аффинность исходного антитела нечеловеческого происхождения. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или большее количество переменных доменов, в которых HVR, например, CDR (или их фрагменты)

происходят от антитела нечеловеческого происхождения, а FR (или их фрагменты) происходят от последовательностей антитела человека. В некоторых случаях гуманизованное антитело также содержит по меньшей мере фрагмент константной области антитела человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения некоторые FR-остатки в гуманизованном антителе заменяют соответствующими остатками антитела нечеловеческого происхождения (например, антитела, из которого получены остатки HVR), например, с целью восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Гуманизованные антитела и способы их получения описаны, например, в публикациях Almagro и Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1619-1633 (2008), и дополнительно описаны, например, в Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 (1989); в патентах США №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri et al., *Methods* 36: 25-34 (2005) (описание прививания SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28: 489-498 (1991) (описание "изменения поверхности"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36: 43-60 (2005) (describing "FR shuffling"); и Osbourn et al., *Methods* 36: 6168 (2005), а также в Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83: 252-260 (2000) (описание подхода "направленной селекции" к перетасовке FR).

Каркасные области человека, которые можно применять для гуманизации, включают в себя, но не ограничиваются ими: каркасные области, выбранные с помощью методики «наилучшего соответствия» (см., например, Sims et al. *J. Immunol.* 151: 2296 (1993)); каркасные области, происходящие от консенсусной последовательности антител человека конкретной подгруппы переменных областей легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); и Presta et al. *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)); зрелые (содержащие соматические мутации) каркасные области человека или эмбриональные каркасные области человека (см., например, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1619-1633 (2008)); и каркасные области, полученные в результате скрининга библиотек FR (см., например, Vasa et al., *J. Biol. Chem.* 272: 1067810684 (1997) и Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271: 22611-22618 (1996)).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения sdAb являются модифицированными, например, гуманизованными, без уменьшения нативной аффинности домена к антигену и со снижением его иммуногенности по отношению к гетерологичным видам. Например, можно определить аминокислотные остатки переменного домена антитела (V_HH) из антитела ламы, при этом одна или большее количество аминокислот представителей семейства верблюдовых, например, в каркасных

областях, заменяются их человеческим аналогом, как было обнаружено в консенсусной последовательности человека, без потери этим полипептидом своих типичных характеристик, то есть, гуманизация не оказывает существенного влияния на антигенсвязывающую способность полученного полипептида. Гуманизация sdAb представителей семейства верблюдовых требует введения и мутагенеза ограниченного количества аминокислот в одной полипептидной цепи. Это контрастирует с гуманизацией scFv, Fab', (Fab')₂ и IgG, при которой требуется введение аминокислотных изменений в две цепи, легкую и тяжелую цепь, и сохранение сборки обеих цепей.

Однодоменные антитела, содержащие домен V_HH, могут быть гуманизованы с целью получения человекоподобных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения FR области домена V_HH, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере около 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % или более гомологий аминокислотной последовательности с каркасными областями V_H человека. Один типовый класс гуманизованных доменов V_HH характеризуется тем, что V_HH несут аминокислоту из группы, состоящей из глицина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, пролина, фенилаланина, тирозина, триптофана, метионина, серина, треонина, аспарагина или глутамина в положении 45, такого как, например, L45 и триптофана в положении 103, согласно нумерации Kabat. Как таковые, полипептиды, относящиеся к этому классу, характеризуются высокой гомологией аминокислотной последовательности с каркасными областями V_H человека, при этом указанные полипептиды можно вводить человеку непосредственно без вероятности развития нежелательной иммунной реакции на полипептид и без нагрузки дальнейшей гуманизации.

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

4. Человеческие антитела

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложенное в данном документе антитело представляет собой антитело человека. Антитела человека можно получить, используя различные методики, известные в данной области техники. Антитела человека описаны в общих чертах в van Dijk и van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) и Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20: 450-459 (2008). В данной области техники известны трансгенные мыши или крысы, способные продуцировать полностью человеческие sdAb. См, например, US20090307787A1, патент США № 8754287, US20150289489A1, US20100122358A1 и WO2004049794.

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

Антитела человека также можно получить с помощью гибридных способов. Описаны человеческие миеломные и мышино-человеческие гетеромиеломные клеточные линии, применяемые для получения человеческих моноклональных антител. (См., например,, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)). Антитела человека, полученные посредством технологии на основе В-клеточной гибридомы человека, также описаны в Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3557-3562 (2006). Дополнительные способы включают в себя описанные, например, в патенте США 7189826 (в котором описано получение моноклональных антител IgM человека из гибридных клеточных линий) и в публикации

Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4): 265-268 (2006) (в которой описаны полностью человеческие гибридомы). Методика гибридом человека (методика Trioma) также описана в Vollmers и Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3): 927-937 (2005), а также в Vollmers и Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3): 185-91 (2005).

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

Одна методика для получения последовательностей V_HH, направленных против конкретного антигена или мишени, включает в себя соответствующую иммунизацию трансгенного млекопитающего, способного экспрессировать антитела с тяжелой цепью (то есть, с целью усиления иммунного ответа и/или антитела с тяжелой цепью, направленных против указанного антигена или мишени), получение пригодного биологического образца от указанного трансгенного млекопитающего, который содержит (кодирующие нуклеотидные последовательности) указанные последовательности V_HH (такие как образец крови, образец сыворотки или образец В-клеток), с последующей генерацией последовательностей V_HH, направленных против указанного антигена или мишени, начиная с указанного образца, с применением любого пригодного способа, по существу известного в данной области техники (такого как любой из описанных в данном документе способов или методика гибридомы). Например, для этой цели можно использовать мышей, экспрессирующих антитела с тяжелой цепью, и другие способы и методики, которые описаны в WO 02/085945, WO 04/049794 и WO 06/008548 и Janssens et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006 Oct. 10; 103(41): 15130-5. Например, мыши, экспрессирующие антитела с тяжелой цепью, могут экспрессировать антитела с тяжелой цепью с любым пригодным (одиночным) варибельным доменом, таким как (одиночные) варибельные домены из природных источников например, (одиночные) варибельные домены человека, (одиночные) варибельные домены представителей семейства верблюдовых или (одиночные) варибельные домены акулы, а также, например, синтетические или полусинтетические (одиночные) варибельные домены.

5. Антитела, полученные из библиотек

Антитела по данному изобретению можно выделить путем скрининга комбинаторных библиотек на предмет антител, обладающих желательной активностью

или желательными активностями. Например, в данной области техники известны различные способы для создания библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек на антитела, обладающие желательными характеристиками связывания. Такие способы рассмотрены, например, в публикации Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) и дополнительно описаны, например, в статьях McCafferty et al., *Nature* 348: 552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks и Bradbury, в *Methods in Molecular Biology* 248: 161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); и Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004). Способы конструирования библиотек sdAb описаны, например, в патенте США №7371849.

В некоторых способах фаговых дисплеев репертуары генов V_H и V_L отдельно клонируют посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рекомбинируют случайным образом в фаговых библиотеках, которые затем можно подвергнуть скринингу на антиген-связывающие фаги, как описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Как правило, фаг отображает фрагменты антител либо в виде одноцепочечных фрагментов Fv (scFv), либо в виде фрагментов Fab. Библиотеки, полученные из иммунизированных источников, содержат антитела, обладающие высокой аффинностью к иммуногену, следовательно, необходимость конструирования гибридом отпадает. В альтернативном варианте, можно клонировать наивный репертуар (например, человека) для получения единого источника антител к широкому спектру чужеродных антигенов, а также аутоантигенов без иммунизации, как описано в публикации Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Наконец, наивные библиотеки можно также получить путем синтеза, клонируя сегменты V-генов стволовых клеток, не подвергавшиеся реаранжировке, и применяя ПЦР-праймеры, содержащие случайные последовательности, для кодирования гипервариабельной области CDR3 и осуществления реаранжировки *in vitro*, как описано в публикации Hoogenboom и Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Патентные публикации, в которых описаны фаговые библиотеки антител человека включают в себя, например: патент США № 5750373 и патентные публикации США №№ 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

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

6. Мультиспецифические антитела

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

Биспецифические антитела можно получить в виде полноразмерных антител или в виде фрагментов антител. Способы получения мультиспецифических антител включают в себя, но не ограничиваются ими, рекомбинантную совместную экспрессию двух пар тяжелая цепь - легкая цепь иммуноглобулина с различной специфичностью (см. Milstein и Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829 и Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655, 1991), и инженерии согласно принципу "выступ-во-впадину" (см., например, патент США № 5731168) Мультиспецифические антитела также можно получить за счет конструирования электростатических направляющих эффектов для создания гетеродимерных молекул на основе Fc антител (WO 2009/089004A1); перекрестного сшивания двух или большего количества антител или фрагментов (см., например, патент США № 4676980, и Brennan et al., *Science*, 229: применения лейциновых "молний" для получения биспецифических антител s (см., например, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); применения технологии "диател" для изготовления биспецифических фрагментов антител (см., например, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)); и применения одноцепочечных Fv- (sFv-) димеров (см., например, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)); и получения триспецифических антител, как описано, например, в Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991); и создания полипептидов, содержащих тандемные однодоменные антитела (см., например, заявку на патент США № 20110028695; и Conrath et al. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276(10): 7346-50). В данный документ также включено конструирование антител с тремя или большим количеством функциональных

антигенсвязывающих участков, включая "антитела-осьминоги" (см., например, US 2006/0025576A1).

7. Варианты антител

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

а) Варианты замен, вставок и делеций

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

Таблица 3. Аминокислотные замены

Исходный остаток	Типовые замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser

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

Аминокислоты можно сгруппировать по общим свойствам боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

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

Один тип вариантов, полученных путем замены, включает замену одного или большего количества остатков гипервариабельной области родительского антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, полученный(е) вариант(ы), отобранный для дальнейшего исследования, характеризуются

модификациями (например, улучшением) определенных биологических свойств (например, повышенной аффинностью, сниженной иммуногенностью) по сравнению с родительским антителом и/или в значительной степени сохраняет определенные биологические свойства родительского антитела. Типовой вариант, получаемый путем замены, представляет собой антитело с созревшей аффинностью, которое легко получить, например, с помощью методик созревания аффинности на основе фагового дисплея, например, описанных в данном документе. Вкратце, один или большее количество остатков HVR мутируют и варианты антитела подвергают фаговому дисплею и скринингу на предмет конкретной биологической активности (например, аффинности связывания).

Модификации (например, замены) можно внести в HVR, например, для улучшения аффинности антитела. Такие модификации можно внести в "горячие точки" HVR, то есть остатки, кодируемые кодонами, с высокой частотой подвергающимся мутациям во время соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179-196 (2008)), и/или SDR (а-CDR), с тестированием аффинности связывания полученного варианта V_H или V_L . Созревание аффинности путем конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек было описано, например, в *Methods in Molecular Biology* 178: 137 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). В некоторых вариантах осуществления созревания аффинности вносят разнообразие в переменные гены, выбранные для созревания с помощью одного из ряда способов (например, ПЦР пониженной точности, перетасовки цепей или олигонуклеотид-направленного мутагенеза). Затем создают вторичную библиотеку. После этого библиотеку подвергают скринингу для выявления вариантов антитела с желательной аффинностью. Другой способ для внесения разнообразия включает подходы, направленные на HVR, в которых несколько аминокислотных остатков HVR (например, 4-6 аминокислотных остатков подряд) являются рандомизированными. Остатки HVR, участвующие в связывании антигена, можно специфически определить, например, с помощью мутагенеза с аланиновым сканированием или моделированием. При этом мишенями часто являются CDR-H3 и CDR-L3.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения замены, вставки или делеции могут возникать в одной или большем количестве HVR при условии, что такие модификации по существу не снижают способность антитела к связыванию антигена. Например, в HVR можно ввести консервативные модификации (например, консервативные замены, как предложено в данном документе), которые по существу не

снижают аффинность. Такие модификации могут располагаться за пределами "горячих точек" HVR или SDR. В некоторых вариантах осуществления вариантных последовательностей V_HH, приведенных выше, каждая HVR является либо не измененной, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

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

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

b) Варианты гликозилирования

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

Если антитело содержит Fc-область, можно изменить присоединенный к ней углевод. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, как правило,

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

В одном варианте осуществления данного изобретения предлагаются варианты антител, содержащие углеводную структуру с недостаточным количеством фукозы, присоединенной (непосредственно или косвенно) к Fc-области. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1 % до 80 %, от 1 % до 65 %, от 5 % до 65 % или от 20 % до 40 %. Количество фукозы определяют путем расчета среднего количества фукозы в углеводной цепи при Asn297 по отношению к сумме всех углеводных структур, присоединенных к Asn 297 (например, сложных гибридных структур с высоким содержанием маннозы), измеренного с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному приблизительно в положении 297 в Fc-области (EU-нумерация остатков Fc-области); однако Asn297 также может располагаться на расстоянии приблизительно ± 3 аминокислоты выше или ниже положения 297, то есть между положениями 294 и 300, изза незначительной изменчивости последовательности антител. Такие фукозилированные варианты могут обладать улучшенной функцией АЗКЦ. См., например, публикации патентов США №№. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, касающихся "дефукозилированных" или "фукозодефицитных" вариантов антитела, включают в себя: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают в себя клетки Lec13 CHO, дефектные по фукозилированию белка (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); патентная заявка США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно пример 11), и линии клеток с нокаутом, например, клетки CHO с нокаутом гена альфа-

1,6фукозилтрансферазы FUT8, (см., например, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4): 680-688 (2006); b WO2003/085107).

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

с) Варианты Fc-области

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

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

описаны в патенте США № 5500362 (см., например, Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 70597063 (1986)) и Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 1499-1502 (1985); 5,821,337 (см. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166: 1351-1361 (1987)). В альтернативном варианте можно использовать анализы, не связанные с применением радиоактивных веществ (см., например, анализ цитотоксичности АСТП™ для проточной цитометрии без применения радиоактивных веществ (CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, Калифорния); и анализ цитотоксичности CytoTox 96® без использования радиоактивных веществ (Promega,

Мэдисон, Висконсин). В качестве эффекторных клеток в таких анализах можно применять мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и клетки-натуральные киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте активность АЗКЦ молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, на модели животного, такой как описано в публикации Clynes et al., PNAS USA 95: 652-656 (1998). Кроме того, можно выполнить анализ связывания C1q с целью подтверждения неспособности антитела связывать C1q и, следовательно, отсутствия КЗЦ-активности. См., например, анализ связывания C1q и C3c методом ИФА в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента можно выполнить анализ КЗЦ (см., например, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101: 1045-1052 (2003); а также Cragg, M. S. и M. J. Glennie, Blood 103: 2738-2743 (2004)). Определение связывания с FcRn и клиренса/периода полувыведения *in vivo* также может быть выполнено с помощью способов, известных в данной области техники (см., например, Petkova, S. B. et al. Int'l. Immunol. 18(12): 1759-1769 (2006)).

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

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вариант антитела содержит Fc-область с одной или большим количеством аминокислотных замен, которые улучшают АЗКЦ (антителозависимую клеточно-обусловленную цитотоксичность),

например, с заменами в положениях 298, 333 и/или 334 Fc- области (EU-нумерация остатков).

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

Антитела с увеличенным периодом полувыведения и улучшенным связыванием с неонатальным рецептором Fc (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)), описаны в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Указанные антитела содержат Fc-область с одной или большим количеством замен, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Такие варианты Fc включают в себя те, которые имеют замены в одном или большем количестве остатков Fc-области: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, замену аминокислотного остатка 434 в Fc-области (патент США № 7371826).

См. также Duncan & Winter, *Nature* 322: 738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США 5624821; и WO 94/29351 в отношении других примеров вариантов Fc-области.

d) Варианты антител, сконструированные путем введения цистеина

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

e) Производные антител

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело, предлагаемое в данном документе, можно дополнительно модифицировать путем введения дополнительных небелковых фрагментов, известных в данной области техники и легко доступных. Фрагменты, которые можно использовать для дериватизации антитела, включают в себя, но не ограничиваются перечисленным, водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают в себя полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (гомополимеры или случайные сополимеры) и декстран или поли(пвинилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры пропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси, но не ограничиваются ими. Преимуществом пропионового альдегида полиэтиленгликоля в производстве является его стабильность в воде. Полимер может иметь любой молекулярный вес и может быть разветвленным или неразветвленным. Число полимеров, присоединенных к антителу, может изменяться, и, в случае присоединения более одного полимера, они могут представлять собой одинаковые или разные молекулы. Как правило, число и/или тип полимеров, применяемых для дериватизации, можно определить с учетом факторов, включающих, но не ограничиваясь перечисленным, конкретные свойства или функции антитела, подлежащие улучшению, независимо от того, будет ли производное антитела применяться в терапии при определенных условиях, и др.

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

Способы получения

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

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

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

1. Поликлональные антитела

Как правило, уровень поликлональных антител повышается у животных в результате множества подкожных (п/к) или внутрибрюшинных (в/бр) инъекций соответствующего антигена и адъюванта. Может быть полезным конъюгирование соответствующего антигена с белком, который является иммуногенным для видов, подлежащих иммунизации, например, гемоцианином фиссуреллы (KLH), сывороточным альбумином, бычьим тиреоглобулином или ингибитором трипсина соевых бобов с применением бифункционального или дериватирующего агента, например, малеимидобензоилсульфосукцинимидного эфира (конъюгирование через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глутарового альдегида, янтарного ангидрида, SOCl_2 , или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R^1 являются независимо низшими алкильными группами. Примеры адъювантов, которые могут применяться, включают в себя полный адъювант Фрейнда и адъювант MPL-TDM (монофосфорил липид A, синтетический дикориномиколат трегалозы). Протокол иммунизации может быть выбран специалистом в данной области техники без излишних экспериментов.

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

2. Моноклональные антитела

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

Например, моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридного способа, впервые описанного Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), или могут быть получены с помощью способов рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567).

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

Иммунизирующий агент обычно включает в себя антигенный белок или его вариант слияния. Как правило, если желательны клетки человеческого происхождения, применяют лимфоциты периферической крови ("ЛПК"), а если желательны источники из млекопитающих, не относящихся к человеку, применяют клетки селезенки или клетки

лимфатических узлов. Затем лимфоциты соединяют с линией immortalized клеток, с применением пригодного агента слияния, такого как полиэтиленгликоль, с целью образования гибридной клетки. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103.

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

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

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

Культуральную среду, в которой культивируются гибридные клетки, можно анализировать на наличие моноклональных антител, направленных против антигена,

представляющего интерес. Предпочтительно аффинность связывания и специфичность моноклонального антитела можно определять с помощью иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммуноанализ (РИА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Такие способы и анализы известны в данной области техники. Например, аффинность связывания можно определить с помощью анализа Скэтчарда, описанного Munson et al., *Biochem.*, 107: 220 (1980).

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

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

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

В дополнительном варианте осуществления данного изобретения антитела можно выделить из фаговых библиотек антител, сгенерированных с помощью способов описанных в публикации McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) описывают

выделение антител мыши и человека, соответственно, с применением фаговых библиотек. В последующих публикациях описано получение антител человека с высокой аффинностью (диапазон нМ) путем перетасовки цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), а также комбинаторное инфицирование и рекомбинация *in vivo* в качестве стратегии построения очень больших фаговых библиотек (Waterhouse et al., *Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Таким образом, эти методы являются эффективными альтернативами традиционным методам гибридомы моноклональных антител для выделения моноклональных антител.

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

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

Химерные или гибридные антитела также можно получить *in vitro* с помощью известных способов, применяемых в химии синтетических белков, включая соединения, содержащие сшивающие агенты. Например, иммунотоксины могут быть сконструированы с помощью реакции дисульфидного обмена или путем образования тиоэфирной связи.

Примеры пригодных реагентов для этой цели включают в себя иминотиолат и метил-4меркаптобутиримидат.

3. Рекомбинантная продукция в прокариотических клетках

а) Конструкция вектора

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

В большинстве случаев плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые получены из видов, совместимых с клеткой-хозяином, применяют применительно к этим хозяевам. Вектор обычно несет участок репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечить фенотипический отбор в трансформированных клетках. Например, *E. coli* обычно трансформируют с применением pBR322, плазмиды, полученной из видов *E. coli*. pBR322 содержит гены, кодирующие устойчивость к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tet) и, таким образом, обеспечивает простой способ идентификации трансформированных клеток. pBR322, ее производные или другие микробные плазмиды или бактериофаг также могут содержать или быть модифицированными, чтобы содержать промоторы, которые могут использоваться микробным организмом для экспрессии эндогенных белков. Примеры

производных pBR322, применяемых для экспрессии конкретных антител, подробно описаны в публикации Carter et al. ,патенте США № 5648237.

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

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

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

Промоторы, пригодные для применения с прокариотическими хозяевами, включают в себя промотор PhoA, системы промоторов галактамазы и лактозы, систему промоторов триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac* или *trc*. Однако пригодны и другие промоторы, которые являются функциональными в бактериях (например, другие известные бактериальные или фаговые промоторы). Их последовательности нуклеиновых кислот опубликованы в литературе, что позволяет

квалифицированному специалисту оперативно лигировать их с цистронами, кодирующими целевые легкие и тяжелые цепи (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) с помощью линкеров или адаптеров для обеспечения любых требуемых участков рестрикции.

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения продукция антител согласно данному изобретению может происходить в цитоплазме клетки-хозяина и, следовательно, не требует наличия сигнальных последовательностей секреции в каждом цистроне. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептидные компоненты, такие как полипептид, кодирующий домен V_H первой антигенсвязывающей части, в некоторых случаях слитой со второй антигенсвязывающей частью, и полипептид, кодирующий домен V_L первой антигенсвязывающей части, в некоторых случаях слитой со второй антигенсвязывающей частью, экспрессируют, придают им складчатую структуру и собирают, тем самым получая функциональные антитела в цитоплазме. Определенные штаммы хозяина (например, штаммы *E. coli* trxB⁻) обеспечивают состояние цитоплазмы, которое является благоприятным для образования дисульфидных связей, что позволяет правильно придавать складчатую структуру и собирать экспрессированные белковые субъединицы. Proba and Pluckthun Gene, 159: 203 (1995).

В данном изобретении предлагается система экспрессии, в которой количественное соотношение экспрессированных полипептидных компонентов может модулироваться,

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

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

b) Прокариотические клетки-хозяева.

Прокариотические клетки-хозяева, пригодные для экспрессии антител по данному изобретению, включают в себя архабактерии и эубактерии, такие как грамотрицательные

или грамположительные организмы. Примеры пригодных бактерий включают в себя *Escherichia* (e.g., *E. coli*), *Bacilli* (e.g., *B. subtilis*), *Enterobacteria*, *Pseudomonas species* (e.g., *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* или *Paracoccus*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения применяют грамотрицательные клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки *E. coli* применяют в качестве хозяев в данном изобретении. Примеры штаммов *E. coli* включают в себя штамм W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. (Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1987, pp. 1190-1219; № депонирования в ATCC 27325) и их производные, включая штамм 33D3, имеющий генотип W3110 *AfhuA* (*AtonA*) *ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-fepE) degP41 kan^R* (см. в патенте США № 5639635). Также являются пригодными другие штаммы и их производные, такие как *E. coli* 294 (ATCC 31446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31537) и *E. coli* RV308 (ATCC 31608). Эти примеры носят скорее иллюстративный, чем ограничивающий характер. Способы конструирования производных любой из вышеупомянутых бактерий, имеющих определенные генотипы, известны в данной области техники и описаны, например, в публикации Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990). Как правило, необходимо выбирать соответствующие бактерии с учетом воспроизводимости репликона в клетках бактерии. Например, виды *E. coli*, *Serratia* или *Salmonella* можно соответствующим образом применять в качестве клеток-хозяев, когда для доставки репликона применяют хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410.

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

с) Продукция белков

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

существенные барьеры клеточной стенки. В другом способе трансформации применяют полиэтиленгликоль/ДМСО. Еще одним применяемым способом является электропорация.

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

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

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

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

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

В альтернативном варианте, белок продуцируют в большом количестве с помощью процесса ферментации. Для продукции рекомбинантных белков доступны различные крупномасштабные процедуры ферментации с периодической подпиткой. Крупномасштабные процессы ферментации характеризуются ёмкостью по меньшей мере 1000 литров, предпочтительно от 1000 до 100 000 литров. Эти ферментеры оснащены лопастными мешалками для распределения кислорода и питательных веществ, особенно глюкозы (предпочтительный источник углерода/энергии). Как правило, маломасштабный процесс ферментации предусматривает ферментацию в ферментере, объем которого не превышает около 100 литров, а может составлять от около 1 литра до около 100 литров.

Во время процесса ферментации индукцию экспрессии белка обычно начинают после выращивания клеток в соответствующих условиях до желаемой плотности, например, со значением OD_{550} в диапазоне около 180-220, при котором клетки находятся в ранней стационарной фазе. Как известно в данной области техники и описано выше, согласно применяемой векторной конструкции можно применять множество индукторов. Клетки можно выращивать в течение более коротких периодов перед индуцированием. Как правило, клетки индуцируют в течение около 12-50 часов, хотя период времени индуцирования может быть длиннее или короче.

С целью увеличения количества и повышения качества продуцируемых антител по данному изобретению, можно модифицировать разные условия ферментации. Например, чтобы улучшить правильную сборку и складывание секретируемых полипептидов, для совместного трансформирования прокариотических клеток-хозяев можно применять дополнительные векторы, сверхэкспрессирующие белки-шапероны, такие как белки Dsb

(DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и DsbG) или FkpA (пептидилпролил-цис, транс-изомераза с шапероновой активностью). Продемонстрировано, что белки-шапероны способствуют правильному складыванию и растворимости гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen et al. (1999) *J Bio Chem* 274: 19601-19605; Georgiou et al., патент США № 6083715; Georgiou et al., патент США № 6027888; Bothmann и Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17100-17105; Ramm и Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39: 199-210.

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

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

d) Очистка белка

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

В одном аспекте белок А, иммобилизованный на твердой фазе, применяют для иммуноаффинной очистки антител, содержащих Fc-область по данному изобретению. Белок А представляет собой белок клеточной стенки 41kD из *Staphylococcus aureus*,

который связывается с Fc-областью антител с высокой аффинностью. Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1-13. Твердая фаза, к которой иммобилизован белок А, предпочтительно представляет собой колонку, содержащую поверхность стекла или диоксида кремния, более предпочтительно контролируемую колонку из пористого стекла или колонку с кремниевой кислотой. В некоторых случаях колонку покрывали реагентом, таким как глицерин, с целью предотвращения неспецифической адгезии загрязняющих веществ. Затем твердую фазу промывали для удаления примесей, неспецифически связанных с твердой фазой. Наконец, антитела, представляющие интерес, извлекали из твердой фазы путем элюирования.

4. Рекомбинантная продукция в эукариотических клетках

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

а) Компонент сигнальной последовательности

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

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

б) Источник начала репликации

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

с) Компонент гена отбора

Экспрессионные и клонирующие векторы могут содержать ген отбора, также называемый селективируемым маркером. Типовые гены отбора кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину,

неомицину, метотрексату или тетрациклину, (b) дополняют ауксотрофные дефициты или (в) поставляют критические важные питательные вещества, недоступные из сложных сред, например, ген, кодирующий D-аланиновую рацемазу для *Vacilli*.

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

Другим примером пригодных селективируемых маркеров для клеток млекопитающих являются такие маркеры, которые позволяют идентифицировать клетки, способные принимать нуклеиновую кислоту, кодирующую антитела по данному изобретению, такие как DHFR, тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II, предпочтительно гены металлотионеина примата, аденозиндезаминаза, орнитиндекарбоксилаза и т. д.

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

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

d) Компонент промотора

Как правило, экспрессионные и клонирующие векторы содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей желаемые полипептидные последовательности. Практически все эукариотические гены имеют АТ-обогащенную область, расположенную на расстоянии около 25 - 30 пар оснований против хода транскрипции от участка, где инициируется транскрипция. Другая последовательность, расположенная на расстоянии около 70-80 пар оснований против хода транскрипции от начала транскрипции многих генов, представляет

собой область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. 3'-конец большинства эукариот представляет собой последовательность AATAAA, которая может быть сигналом для добавления поли-А-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности можно вставить в эукариотические экспрессионные векторы.

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

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

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

е) Компонент элемента энхансера

Транскрипцию ДНК, кодирующей антитела по данному изобретению, у высших эукариот, часто повышают путем введения энхансерной последовательности в вектор. В данное время известны многие энхансерные последовательности из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, α -фетопроtein и инсулин). Однако, как правило, можно

применять энхансер от вирусной эукариотической клетки. Примеры включают в себя энхансер SV40 на "поздней" стороне точки начала репликации (100-270 п. о.), цитомегаловирусный энхансер раннего промотора, полиомавирусный энхансер на "поздней" стороне точки начала репликации и аденовирусные энхансеры. См. также публикацию Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) относительно энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в вектор в положении 5' или 3' в кодирующую полипептид последовательность, но предпочтительно расположен на участке 5' от промотора.

f) Компонент терминации транскрипции

Экспрессионные векторы, применяемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжи, грибы, насекомые, растения, животные, человеческие или зародышевые клетки из других многоклеточных организмов) также будут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5'- и, иногда, 3'-нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей полипептид. Одним из пригодных компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота. См. публикацию WO94/11026 и описанный в ней экспрессионный вектор.

g) Отбор и трансформация клеток-хозяев

Пригодные клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в описанных в данном документе векторах включают в себя высшие эукариотные клетки, описанные в данном документе, включая клетки-хозяева позвоночных. Выращивание клеток позвоночных в культуре (культуре тканей) стало обычной процедурой. К примерам пригодных клеточных линий млекопитающих в качестве клеток-хозяев относятся линия клеток CV1 почек обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия эмбриональных клеток почек человека (клетки 293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, которые описаны в публикации Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); клетки почек детеныша хомяка (ВНК, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомяка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251, 1980); клетки почек обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почек африканской зеленой обезьяны (VERO-76, ATCC CRL-1 587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2);

клетки почек собак (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3 A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI-клетки (Mather et al., *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); клетки MRC-5; клетки FS-4; и линии гепатомы человека (Hep G2).

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

h) Культивирование клеток-хозяев

Клетки-хозяева, применяемые для продукции антител по данному изобретению, можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев пригодны коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma), минимальная питательная среда (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла в модификации Дульбекко ((DMEM), Sigma). Кроме того, любую среду, описанную в публикации Ham et al., *Meth. Enz.* 58: 44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), в патентах США № 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; или в патенте Re. 30985, можно применять в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред может быть обогащена по мере необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, солями кальция, магния и фосфатами), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как препарат ГЕНТАМИЦИН™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне), а также глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые будут известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и тому подобное, являются теми, которые ранее применялись с клеткой-хозяином, отобранной для экспрессии, и будут очевидны для обычного квалифицированного специалиста в данной области техники.

i) Очистка белка

При применении рекомбинантных методов, антитела можно получить внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или непосредственно

секретированными в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, на первом этапе частицы дебриса, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты удаляются, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) описывает процедуру выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточную пасту размораживают в присутствии ацетата натрия (рН 3,5), ЭДТК и фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ) в течение около 30 мин. Клеточный дебрис удаляют путем центрифугирования. Если антитело секретируется в среду, супернатанты из таких экспрессионных систем в общем случае сначала концентрируют, используя коммерчески доступный фильтр для концентрирования белка, например, установку для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. С целью ингибирования протеолиза на любом из вышеперечисленных этапов можно применять ингибитор протеазы, такой как PMSF, кроме того, для предотвращения роста случайных контаминирующих агентов можно применять антибиотики.

Композицию белка, полученную из клеток, можно очистить с помощью, например, гидроксилпатитовой хроматографии, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем предпочтительной методикой очистки является аффинная хроматография. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого Fc-домена иммуноглобулина, который присутствует в антителе. Белок А можно применять для очистки антител, которые являются производными от иммуноглобулинов человека, содержащих 1, 2 или 4 тяжелые цепи (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). Белок G рекомендуется для всех изоформ мыши и для человека 3 (Guss et al., *EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). Матрица, к которой присоединяется аффинный лиганд, наиболее часто является агарозой, но также доступны другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как контролируемое пористое стекло или поли(стирол-дивинил)бензол, позволяют ускорить скорость потока и сократить время обработки, по сравнению с агарозной матрицей. Если антитело содержит домен C_{H3}, для очистки пригодной является смола Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Филипсбург, штат Нью-Джерси). В зависимости от антитела, подлежащего извлечению, доступны также другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарине SEPHAROSE™, хроматография на анионной или катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ-электрофорез и осаждение сульфатом аммония.

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

Иммуноконъюгаты

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в котором антитело конъюгировано с одним или большим количеством лекарственных средств, включая, но не ограничиваясь ими, майтансиноид (см. в патентах США №№ 5208020, 5416064 и в Европейском патенте EP 0 425 235 B1); ауристин, например, фрагменты лекарственного средства монометилауристин DE и DF (MMAE и MMAF) (см. в патентах США №№ 5635483 и 5780588, а также 7498298); доластатин; калихеамицин или его производное (см. в патентах США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 и 5877296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53: 3336-3342 (1993); и Lode et al., *Cancer Res.* 58: 2925-2928 (1998)); антрациклин, в том числе дауномицин или доксорубицин (см. Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13: 477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16: 358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16: 717721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12: 1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 188: 147-54 (2002); ив патенте США № 6630579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел; трихотецен; а также CC1065.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, как описано в данном документе, конъюгированное с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая, но не ограничиваясь ими, цепь А дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А

модексина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин или трикотецены.

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

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с применением множества бифункциональных связывающих белок агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио) пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2, 4-динитробензол). Например, рициновый иммунотоксин может быть получен, как описано в Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987). 1-Изоотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA), меченая углеродом-14, представляет собой типичный хелатирующий агент для конъюгирования радионуклеотида с антителом. См. WO94/11026. Линкер может представлять собой "расщепляемый линкер", облегчающий высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно применять кислотолабильный линкер, чувствительный к пептидазам линкер, фотولاбильный линкер, диметильный линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., *Cancer Res.* 52: 127131 (1992); патент США № 5208020).

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

Способы и композиции для диагностики и обнаружения

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения любое из антител (таких как sdAbs), предложенных в данном документе, является пригодным для обнаружения наличия ВСМА в биологическом образце. В данном контексте термин "обнаружение" охватывает количественное или качественное обнаружение. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологический образец представляет собой кровь, сыворотку или другие жидкие образцы биологического происхождения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биологический образец включает клетку или ткань.

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются меченые анти-ВСМА sdAb. Метки включают в себя, но не ограничиваются перечисленным, метки

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

III. Химерные антигенные рецепторы

В одном аспекте данного изобретения предлагается химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий одно или большее количество однодоменных антител (таких как $V_{\text{H}}\text{H}$). Любое одно анти-BCMA sdAb, описанное в разделе II, можно применять в CAR, описанных в данном документе. Типовые структуры CAR проиллюстрированы на Фиг. 15A-15D.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается CAR, нацеленный на BCMA (также упоминаемый в данном документе как "BCMA CAR"), содержащий полипептид, который содержит: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблужьим, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (например, Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен является производным от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий

сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен является производным от костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ВСМА CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 α), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ВСМА CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 α), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца: сигнальный пептид CD8 α , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, производный от CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, производный от CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, производный от CD3 β . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца: сигнальный пептид CD8 α , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD8 α , костимулирующий сигнальный домен, производный от CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, производный от CD3 β . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ВСМА CAR является одновалентным.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается ВСМА CAR, содержащий полипептид, который содержит: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-ВСМА sdAb; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом анти-ВСМА sdAb содержит любой из следующих элементов: (1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77; (2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78; (3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; и CDR3, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 113; или (38) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблужьим, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115-152. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (например, Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен является производным от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен является производным от костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 α), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 α), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до С-конца: сигнальный пептид CD8 α , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, производный от CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, производный от CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, производный от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид содержит от N-конца до Сконца: сигнальный пептид CD8 α , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD8 α , костимулирующий сигнальный домен, производный от CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, производный от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR

вектора или CAR	SEQ ID	SEQ ID		sdAb			CO1	CO2	Перв.
PLLVhEF1a269A37346	216	257	CD8 α	269A37 346	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
PLLVhEF1a269A37348	217	258	CD8 α	269A37 348	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
PLLVhEF1a269A37917	218	259	CD8 α	269A37 917	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
PLLVhEF1a269A37355	219	260	CD8 α	269A37 355	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
PLLVhEF1a269A37915	220	261	CD8 α	269A37 915	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
PLLVhEF1a269A37936	221	262	CD8 α	269A37 936	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
PLLVhEF1a269A37953	222	263	CD8 α	269A37 953	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
PLLVhEF1a269A37965	223	264	CD8 α	269A37 965	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
PLLVhEF1a269A37972	224	265	CD8 α	269A37 972	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ

PLLVhEF1a269A37353	225	266	CD8 α	269A37 353	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
PLLVhEF1a-	226	267	CD8 α	269A37 948	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ

269A37948									
GSI5011 CAR	227	268	CD8 α	269A37 346	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
GSI5019 CAR	228	269	CD8 α	269A37 353	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
GSI5020 CAR	229	270	CD8 α	269A37 917	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B005S	230	271	CD8 α	269B00 5	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B023S	231	272	CD8 α	269B02 3	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B024S	232	273	CD8 α	269B02 4	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B028S	233	274	CD8 α	269B02 8	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B030S	234	275	CD8 α	269B03 0	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B038S	235	276	CD8 α	269B03 8	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B054S	236	277	CD8 α	269B05 4	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B059S	237	278	CD8 α	269B05 9	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B060S	238	279	CD8 α	269B06 0	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ

269B069S	239	280	CD8 α	269B06 9	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B074S	240	281	CD8 α	269B07 4	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B076S	241	282	CD8 α	269B07 6	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B079S	242	283	CD8 α	269B08 3	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B083S	243	284	CD8 α	269B08 5	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B085S	244	285	CD8 α	269B09 3	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B093S	245	286	CD8 α	269B09 4	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B094S	246	287	CD8 α	269B10 4	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B104S	247	288	CD8 α	269B10 9	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B109S	248	289	CD8 α	269B11 0	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B110S	249	290	CD8 α	269B11 3	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B113S	250	291	CD8 α	269B12 6	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B126S	251	292	CD8 α	269B12 9	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B129S	252	293	CD8 α	269B13 1	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B131S	253	294	CD8 α	269B13 5	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ

269B135S	254	295	CD8 α	269B13 6	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B136S	255	296	CD8 α	269B13 9	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ
269B139S	256	297	CD8 α	269B02 4	CD8 α	CD8 α	CD13 7	NA	CD3 ζ

Поливалентные химерные антигенные рецепторы

В данном изобретении также предлагаются мультивалентные CAR, которые имеют два или большее количество (например, около 2, 3, 4, 5, 6 или больше) связывающих фрагментов, которые специфически связываются с антигеном, таким как BCMA. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество связывающих фрагментов являются антигенсвязывающими фрагментами. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество связывающих фрагментов содержат однодоменные антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество связывающих фрагментов являются производными от верблужьих антител. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество связывающих фрагментов являются производными от четырехцепочечного антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество связывающих фрагментов представляют собой scFvs. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество связывающих фрагментов являются производными от антител человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество связывающих фрагментов являются полипептидными лигандами или другими полипептидами, не принадлежащими к антителам, которые специфически связываются с антигеном. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является моноспецифическим, то есть мультивалентный CAR нацелен на один антиген и содержит два или большее количество участков связывания для одного антигена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR является мультиспецифическим, то есть мультивалентный CAR нацелен на более чем один антиген, и при этом мультивалентный CAR содержит два или большее количество участков связывания по меньшей мере для одного антигена. Связывающие фрагменты, специфические для одного и того же антигена, могут связываться с одним и тем же эпитопом антигена (то есть

"моноэпитопный CAR") или могут связываться с различными эпитопами (то есть "мультиэпитопный CAR", такой как двухэпитопный CAR или трехэпитопный CAR) антигена. Участки связывания, специфические для одного и того же антигена, могут содержать одинаковые или разные sdAb.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный (например, двухвалентный, трехвалентный или с большим числом валентностей) химерный антигенный рецептор, содержащий полипептид, который содержит: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество однодоменных (например, по меньшей мере около 2, 3, 4, 5, 6 и более) связывающих фрагментов, специфически связывающихся с антигеном (таким как опухолевый антиген); (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, cMet, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный (например, двухвалентный, трехвалентный или с большим числом валентностей) химерный антигенный рецептор, содержащий полипептид, который содержит: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество (например, по меньшей мере около 2, 3, 4, 5, 6 и более) однодоменных антител (sdAb), специфически связывающихся с антигеном (таким как опухолевый антиген); (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, cMet, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный (например, двухвалентный, трехвалентный или с большим числом валентностей) химерный антигенный рецептор, содержащий полипептид, который содержит: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый связывающий фрагмент, специфически связывающийся с первым эпитопом антигена (такого как опухолевый антиген), и второй связывающий фрагмент, специфически связывающийся со вторым эпитопом антигена; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп отличается от второго эпитопа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3,

CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый связывающий фрагмент представляет собой sdAb, а второй связывающий фрагмент является производным от антитела человека (например, scFv). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый связывающий фрагмент представляет собой sdAb, а второй связывающий фрагмент представляет собой полипептидный лиганд. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый эпитоп является таким же, как второй эпитоп. В некоторых дополнительных вариантах осуществления данного изобретения первый эпитоп отличается от второго эпитопа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультивалентный CAR специфически связывается с двумя различными эпитопами на антигене. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультивалентный CAR специфически связывается с тремя или большим количеством различных эпитопов на антигене.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный (например, двухвалентный, трехвалентный или с большим числом валентностей) химерный антигенный рецептор, содержащий полипептид, который содержит: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое sdAb, специфически связывающееся с первым эпитопом антигена (такого как опухолевый антиген), и второе sdAb, специфически связывающееся со вторым эпитопом антигена; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп отличается от второго эпитопа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения связывающие фрагменты, такие как sdAb (включая множество sdAb или первое sdAb и/или второе sdAb), являются верблюжьими, химерными, человеческими или гуманизированными. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения связывающие фрагменты или sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидных связей или пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения

внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (например, Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен является производным от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен является производным от костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультивалентный CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 α), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультивалентный CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 α), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид содержит от N-конца до С-конца: сигнальный пептид CD8 α , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD8, костимулирующий сигнальный домен, производный от CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, производный от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультивалентный CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультивалентный CAR является мультиспецифическим, например, биспецифическим.

Описанные в данном документе мультивалентные CAR могут быть особенно пригодны для нацеливания на мультимерные антигены посредством синергетического связывания различными участками связывания антигена или для усиления аффинности связывания или avidности к антигену. Любое из описанных в данном документе антиBCMA sdAb можно применять во внеклеточном антигенсвязывающем домене мультивалентных CAR, описанных в данном документе. Перечень типовых мультивалентных BCMA CAR, их типовых последовательностей, конструкций и векторов приведен в Таблице 5.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный CAR, нацеленный на BCMA, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество (например, по меньшей мере, около

2, 3, 4 или большее количество) ВСМА-связывающих фрагментов (например, анти-ВСМА sdAb); (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен. Для построения мультивалентного ВСМА CAR можно применять любое из анти-ВСМА sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внеклеточный антигенсвязывающий домен специфически связывается с одним эпитопом ВСМА, и эти CAR упоминаются в данном документе как моноэпитопные мультивалентные ВСМА CAR.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный ВСМА CAR, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество (например, по меньшей мере около 2, 3, 4 или большее количество) анти-ВСМА sdAb; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом анти-ВСМА sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный ВСМА CAR (также упоминаемый в данном документе как "мультиэпитопный мультивалентный CAR"), содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий по меньшей мере два (например, 2, 3, 4 или большее количество) ВСМА-связывающих фрагмента; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом по меньшей мере два ВСМА-связывающих фрагмента специфически связываются по меньшей мере с двумя различными эпитопами на ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит первый ВСМА-связывающий фрагмент и второй ВСМА-связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой анти-ВСМА sdAb, а второй ВСМА-связывающий фрагмент является производным от антитела человека (например, scFv). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой sdAb, а второй ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой ВСМА полипептидный лиганд. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент и/или второй ВСМА-связывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом на ВСМА, производным от аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 388-394. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый

BCMAсвязывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом, производным от SEQ ID NO: 389 и/или 390. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второй BCMA-связывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом, производным от SEQ ID NO: 391 и/или 392.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный BCMA CAR, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое анти-BCMA sdAb и второе анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первое анти-BCMA sdAb и второе анти-BCMA sdAb специфически связываются с различными эпитопами на BCMA. Для построения мультивалентного BCMA CAR можно применять любое из анти-BCMA sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-BCMA sdAb и/или второе анти-BCMA sdAb специфически связывается с эпитопом на BCMA, производным от аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 388-394. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-BCMA sdAb специфически связывается с эпитопом, производным от SEQ ID NO: 389 и/или 390. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второе анти-BCMA sdAb специфически связывается с эпитопом, производным от SEQ ID NO: 391 и/или 392.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный BCMA CAR, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое анти-BCMA sdAb и второе анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первое анти-BCMA sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79; и при этом второе анти-BCMA sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второе анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второе анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный BCMA CAR, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое анти-BCMA sdAb и второе анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первое анти-BCMA sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86; и при этом анти-BCMA sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второе анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный BCMA CAR, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое анти-BCMA sdAb и второе анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первое анти-BCMA sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83; и при этом анти-BCMA sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второе анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный BCMA CAR, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое анти-BCMA sdAb и второе анти-BCMA sdAb; (b)

трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первое анти-BCMA sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; и при этом анти-BCMA sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второе анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный BCMA CAR, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое анти-BCMA sdAb и второе анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первое анти-BCMA sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и при этом анти-BCMA sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второе анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный BCMA CAR, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое анти-BCMA sdAb и второе анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первое анти-BCMA sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; и при этом анти-BCMA sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66

и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второе анти-BCMA sdAb содержит домен V_HH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый BCMA-связывающий фрагмент (например, первое анти-BCMA sdAb) расположен на N-конце второго BCMA-связывающего фрагмента (например, второго анти-BCMA sdAb). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый BCMA-связывающий фрагмент (например, первое анти-BCMA sdAb) расположен на C-конце второго BCMA-связывающего фрагмента (например, второго анти-BCMA sdAb). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый BCMA-связывающий фрагмент (например, первое анти-BCMA sdAb) и второй BCMA-связывающий фрагмент (например, второе анти-BCMA sdAb) являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (например, T-клетки). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен является производным от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен является производным от костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультивалентный BCMA CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 α), расположенный между C-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультивалентный BCMA CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 α), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид содержит от N-конца до C-конца: сигнальный пептид CD8 α , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный

домен CD8 α , трансмембранный домен CD8 α , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультивалентный ВСМА CAR является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультивалентный ВСМА CAR является трехвалентным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультивалентный ВСМА CAR специфически связывается с двумя различными эпитопами на ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультивалентный ВСМА CAR специфически связывается с тремя или большим количеством различных эпитопов на ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный ВСМА CAR, содержащий полипептид, характеризующийся по меньшей мере около 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 298-335. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультивалентный ВСМА CAR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 298-335. Также предлагается полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 298-335.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любой из мультивалентных ВСМА CAR, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, характеризующаяся по меньшей мере около 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-373. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336-373. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот,

кодирующих поливалентные BCMA CAR, описанные выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой невирусный вектор.

Типовые мультивалентные BCMA CAR приведены в Таблице 5 ниже.

Таблица 5. Типовые мультивалентные BCMA CARs.

CAR	Тип. АК SEQ ID	Тип. НК SEQ ID	SP	Внеклеточный антигенсвязывающий домен					Шарнир	ТМ	Внутриклеточная сигнализация	
				sdAb #1	Lnk. #1 SEQ ID	sdAb #2	Lnk. #2 SEQ ID	sdAb #3			CO 1	Перв.
GSI 5014	298	336	CD 8 α	269A3 7346	208	269A3 7346	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
GSI 5015	299	337	CD 8 α	269A3 7346	208	269A3 7346	208	269A3 7346	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
GSI 5021	300	338	CD 8 α	269A3 7353	208	269A3 7917	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
GSI 5022			8 α	7353		7917			8 α	8 α	137	3 ζ
GSI 5023	302	340	CD 8 α	269A3 7353	215	269A3 7917	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
GSI 5024	303	341	CD 8 α	269A3 7917	209	269A3 7353	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
GSI 5025	304	342	CD 8 α	269A3 7917	213	269A3 7353	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
GSI 5026	305	343	CD 8 α	269A3 7917	214	269A3 7353	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ

BC AR0 01	306	344	CD 8 α	269A3 7353	208	269A3 7948	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 02	307	345	CD 8 α	269A3 7353	213	269A3 7948	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 03	308	346	CD 8 α	269A3 7353	215	269A3 7948	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 04	309	347	CD 8 α	269A3 7948	209	269A3 7353	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 05	310	348	CD 8 α	269A3 7948	213	269A3 7353	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 06	311	349	CD 8 α	269A3 7948	214	269A3 7353	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 07	312	350	CD 8 α	269A3 7953	208	269A3 7948	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 08	313	351	CD 8 α	269A3 7953	213	269A3 7948	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC	314	352	CD	269A3	215	269A3	NA	NA	CD	CD	CD	CD

AR0 09			8 α	7953		7948			8 α	8 α	137	3 ζ
BC AR0 10	315	353	CD 8 α	269A3 7953	209	269A3 7948	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ

BC AR0 21	326	364	CD 8 α	269B0 54	215	269B0 60	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 22	327	365	CD 8 α	269B0 54	209	269B0 60	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 23	328	366	CD 8 α	269B0 54	213	269B0 60	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 24	329	367	CD 8 α	269B0 54	214	269B0 60	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 25	330	368	CD 8 α	269B0 60	208	269B0 94	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 26	331	369	CD 8 α	269B0 60	213	269B0 94	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 27	332	370	CD 8 α	269B0 60S	215	269B0 94	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 28	333	371	CD 8 α	269B0 60	209	269B0 94	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 29	334	372	CD 8 α	269B0 60	213	269B0 94	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ
BC AR0 30	335	373	CD 8 α	269B0 60	214	269B0 94	NA	NA	CD 8 α	CD 8 α	CD 137	CD 3 ζ

Мультиспецифический химерный антигенный рецептор

В данном изобретении также предлагаются мультиспецифические химерные антигенные рецепторы, нацеленные на два или большее количество (например, на около 2, 3, 4, 5, 6 или большее количество) различных антигенов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифический CAR имеет один антигенсвязывающий участок для каждого антигена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифический CAR имеет более двух участков связывания по меньшей мере для одного антигена. Каждый антигенсвязывающий участок может содержать sdAb. Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифический CAR представляет собой биспецифический CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий два разных sdAb, каждое из которых специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR представляет собой триспецифический CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий три разных sdAb, каждое из которых специфически связывается с антигеном.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается мультиспецифический (например, биспецифический) химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий полипептид, который содержит: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с ВСМА, и второе однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся со вторым антигеном (таким как опухолевый антиген); (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый антиген отличается от второго антигена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второй антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO1, MAGE A3 и гликолипида F77. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb и/или второе sdAb является верблюжьим, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое sdAb и второе sdAb являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный

внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (например, Тклетки). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен является производным от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен является производным от костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифический CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 α), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифический CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 α), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид содержит от N-конца до С-конца: сигнальный пептид CD8 α , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD8 α , костимулирующий сигнальный домен, производный от CD137 и первичный внутриклеточный сигнальный домен, производный от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид содержит от N-конца до С-конца: сигнальный пептид CD8 α , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен, производный от CD28, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, производный от CD3 ζ .

Внеклеточный антигенсвязывающий домен

Внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR, описанный в данном документе, содержит один или большее количество (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или большее количество) связывающих фрагментов, такие как sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество связывающих фрагментов являются антителами или их антигенсвязывающими фрагментами. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество связывающих фрагментов являются производными от четырехцепочечных антител. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество связывающих фрагментов являются производными от верблюжьих антител. В некоторых

вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество связывающих фрагментов являются производными от антител человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество связывающих фрагментов являются связывающими белками, не принадлежащими к антителам, такими как полипептидные лиганды или сконструированные белки, которые связываются с антигеном. Связывающие фрагменты могут быть слиты друг с другом непосредственно с помощью пептидных связей или с помощью пептидных линкеров.

1. Однодоменные антитела

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий одно или большее количество sdAbs. SdAb могут быть одинакового или разного происхождения и одинакового или разного размера. Типовые sdAb включают в себя, но не ограничиваются ими, переменные домены тяжелой цепи из антител только с тяжелой цепью (например, V_{NH} или V_{NAR}), связывающие молекулы, по своей природе лишенные легких цепей, единичные домены (такие как V_H or V_L), производные от обычных 4-цепочечных антител, гуманизированные антитела только с тяжелой цепью, sdAb человека, продуцируемые трансгенными мышами или крысами, экспрессирующими сегменты тяжелой цепи человека, а также сконструированные домены и однодоменные каркасы, отличные от тех, которые получены из антител. Любые sdAb, известные в данной области техники или разработанные авторами изобретения, включая sdAb, описанные в разделе II данной заявки, можно применять для конструирования CAR, описанных в данном документе. SdAb могут быть получены из любых видов, включая, но не ограничиваясь ими, мышь, крысу, человека, верблюда, ламу, миногу, рыбу, акулу, козу, кролика и быка. Однодоменные антитела, рассматриваемые в данном документе, также включают в себя встречающиеся в природе молекулы sdAb от других видов, кроме представителей семейства верблюдовых и акул.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения sdAb является производным от встречающейся в природе однодоменной антигенсвязывающей молекулы, известной как антитело с тяжелой цепью, лишенное легких цепей (также упоминаемое в данном документе как "антитело только с тяжелой цепью"). Такие однодоменные молекулы описаны в WO 94/04678 и в публикации Hamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363: 446-448, например. Для ясности, переменный домен, являющийся производным от молекулы тяжелой цепи, по своей природе лишенной легкой цепи, обозначается в данном документе как V_{NH} , чтобы можно было отличить его от обычного

V_H четырехцепочечных иммуноглобулинов. Такая молекула V_HH может быть производной от антител, выращенных в организме представителя вида верблюдовых, например, верблюда, ламы, викунии, дромадера, альпаки и гуанако. Другие виды, кроме представителей семейства верблюдовых, могут продуцировать молекулы тяжелой цепи, по своей природе лишенные легкой цепи, причем такие V_HH входят в объем и содержание данного изобретения.

Молекулы V_HH представителей семейства верблюдовых являются примерно в 10 раз меньше, чем молекулы IgG. Они являются одиночными полипептидами и могут быть очень стабильными, сохраняя устойчивость к экстремальным значениям pH и температуры. Более того, они могут быть устойчивыми к действию протеаз, что не относится к обычным 4-цепочечным антителам. Более того, экспрессия *in vitro* V_HH обеспечивает высокий уровень продуцирования правильно сложенных функциональных V_HH . Кроме того, антитела, вырабатываемые в организме представителей семейства верблюдовых, могут распознавать эпитопы, отличные от тех, которые распознаются антителами, продуцируемыми *in vitro*, путем применения библиотек антител или путем иммунизации млекопитающих, не относящихся к семейству верблюдовых (см., например, WO 9749805). Таким образом, мультиспецифические или поливалентные CAR, содержащие один или большее количество доменов V_HH могут более эффективно взаимодействовать с мишенями, чем мультиспецифические или поливалентные CAR, содержащие антигенсвязывающие фрагменты, полученные из обычных 4-цепочечных антител. Поскольку известно, что V_HH связываются с "необычными" эпитопами, такими как впадины или бороздки, аффинность CAR, включающих такие V_HH могут быть более пригодными для терапевтического применения, чем обычные мультиспецифические полипептиды.

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения sdAb является рекомбинантным, CDR-привитым, гуманизированным, верблюжьим, деиммунизированным и/или созданным *in vitro* (например, отобранным с помощью

фагового дисплея). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения аминокислотную последовательность каркасных областей можно изменить путем "оверблуживания" определенных аминокислотных остатков в каркасных областях. "Оверблуживание" относится к замене или замещению одного или большего количества аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности (встречающегося в природе) домена V_H от обычного 4-цепочечного антитела одним или большим количеством аминокислотных остатков, которые встречаются в соответствующем положении (положениях) в домене V_HH антитела тяжелой цепи. Это может быть выполнено с помощью способов известных специалисту в данной области техники, например, согласно дальнейшего описания. Такие "оверблуженные" замены предпочтительно вставляют в положения аминокислот, которые образуют и/или присутствуют на внутренней поверхности V_H-V_L , и/или на так называемых характерных остатках представителей верблюдовых, как определено в данном документе (см., например, WO 94/04678, Davies и Riechmann FEBS Letters 339: 285-290, 1994; Davies and Riechmann Protein Engineering 9 (6): 531-537, 1996; Riechmann J. Mol. Biol. 259: 957-969, 1996; а также Riechmann и Muyldermans J. Immunol. Meth. 231: 25-38, 1999).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения sdAb представляет собой sdAb человека, продуцируемое трансгенными мышами или крысами, экспрессирующими сегменты тяжелой цепи человека. См., например, US20090307787A1, патент США № 8754287, US20150289489A1, US20100122358A1 и WO2004049794. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения sdAb характеризуется созревшей аффинностью.

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения sdAb получают из обычных четырехцепочечных антител. См., например, EP 0 368 684, Ward et al. (Nature 1989 Oct. 12; 341 (6242): 544-6), Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11): 484-490; WO 06/030220; и WO 06/003388.

2. Антитигены

Антиген(ы), являющийся мишенью CAR по данному изобретению, представляют собой молекулы клеточной поверхности. Связывающие фрагменты (такие как sdAb) можно выбрать для распознавания антигена, который функционирует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, ассоциированных с конкретным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиген (например, первый антиген и/ или второй антиген) является опухолевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультиспецифические CAR нацелены на два или большее количество опухолевых антигенов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения опухолевый антиген ассоциирован с В-клеточной малигнизацией. Опухоли экспрессируют ряд белков, которые могут выступать в качестве антигена-мишени для иммунного ответа, в частности иммунных ответов, опосредованных Т-клетками. Антигенами-мишенями для CAR, могут быть антигены, которые экспрессируются на одной пораженной клетке, или антигены, которые экспрессируются на разных клетках, каждая из которых способствует развитию заболевания. Антигенами-мишенями для CAR могут непосредственно или косвенно участвовать в патогенезе заболеваний.

Опухолевые антигены представляют собой белки, которые продуцируются опухолевыми клетками и могут вызывать иммунный ответ, в частности иммунные ответы, опосредуемые Т-клетками. Выбор антигена-мишени по данному изобретению будет зависеть от конкретного типа рака, подлежащего лечению. Типовые опухолевые антигены включают в себя, например, глиома-ассоциированный антиген, карциноэмбриональный антиген (CEA), β -хорионический гонадотропин человека, альфафтопротеин (AFP), лектинреактивный AFP, тиреоглобулин, RAGE-1, MN-CAIX, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2 (AS), кишечную карбоксиэстеразу, mut hsp70-2, M-CSF, простазу, простатспецифический антиген (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, простенин, PSMA, HER2/neu, сурвивин и теломеразу, опухолевый антиген-1 карциномы простаты (PCTA-1), MAGE, ELF2M, нейтрофильную эластазу, эфринB2, CD22, инсулиновый фактор роста (IGF) -I, IGF-II, рецептор IGF-I и мезотелин.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения опухолевый антиген содержит один или большее количество антигенных эпитопов, ассоциированных со злокачественной опухолью. Злокачественные опухоли экспрессируют ряд белков, которые могут выступать в качестве антигенов-мишеней для иммунной атаки. Эти молекулы включают в себя, но не ограничиваются ими, тканеспецифические антигены, такие как MART-1, тирозиназу и gp100 при меланоме и простатическую кислую фосфатазу (PAP) и простат-специфический антиген (PSA) при раке предстательной железы. Другие молекулы-мишени принадлежат к группе связанных с трансформацией молекул, например, онкоген HER2/Neu/ErbB-2. Еще одна группа целевых антигенов - это онкофетальные антигены, такие как карциноэмбриональный антиген (CEA). При В-клеточной лимфоме опухолеспецифический идиотипный иммуноглобулин представляет собой по существу опухолеспецифический иммуноглобулиновый антиген, который уникален для каждой опухоли. Антигены дифференцировки В-клеток, такие как CD 19, CD20 и CD37, являются кандидатами для применения в качестве антигенов-мишеней при В-клеточной лимфоме.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения опухолевый антиген является опухолеспецифическим антигеном (TSA) или опухолеассоциированным антигеном (TAA). TSA является уникальным для опухолевых клеток и не встречается на других клетках в организме. TAA-ассоциированный антиген не является уникальным для опухолевой клетки, а, напротив, экспрессируется на нормальной клетке в условиях, которые не вызывают состояние иммунологической толерантности к антигену. Экспрессия антигена на опухоли может происходить в условиях, которые позволяют иммунной системе реагировать на антиген. TAA могут быть антигенами, которые экспрессируются на нормальных клетках в период развития плода, когда иммунная система является незрелой и неспособна реагировать, или они могут быть антигенами, которые обычно присутствуют в чрезвычайно низких уровнях на нормальных клетках, но которые экспрессируются в значительно более высоких уровнях на опухолевых клетках.

Неограничивающие примеры антигенов TSA или TAA включают в себя следующее: Дифференцировочные антигены, такие как MART-1/MelanA (MART-I), gp 100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2 и опухолеспецифические мультилокальные антигены, такие как MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE -1, GAGE-2, p15; сверхэкспрессированные эмбриональные антигены, такие как CEA; сверхэкспрессированные онкогены и мутированные гены-супрессоры опухолевого роста, такие как p53, Ras, HER2/neu; уникальные опухолевые антигены, возникающие в результате хромосомных

транслокаций; такие как BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGHIGK, MYL-RAR; и вирусные антигены, такие как антиген EBVA вируса Эпштейна-Барр и антигены вируса папилломы человека (HPV) E6 и E7. Другие крупные белковые антигены включают в себя TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17. 1, NuMa, K-ras, бета-катенин, CDK4, Mum-1, p15, p16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, альфа-фетопроtein, бетаHCG, BSA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27. 29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7Ag, MOV18, NB / 70K, NY-CO-1, RCAS 1, SDCCAG16, TA-90\Mac-2 связывающий белок\C-ассоциированный белок циклофилин, TAAL6, TAG72, TLP и TPS.

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

3. Пептидные линкеры

Различные связывающие фрагменты (такие как sdAb) в мультиспецифических или мультивалентных CAR, описанных в данном документе, могут быть слиты друг с другом посредством пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения связывающие фрагменты (такие как sdAb) являются непосредственно слитыми друг с другом без каких-либо пептидных линкеров. Пептидные линкеры, соединяющие разные связывающие фрагменты (такие как sdAb), могут быть одинаковыми или разными. Различные домены CAR также могут быть слиты друг с другом посредством пептидных линкеров.

Каждый пептидный линкер в CAR может иметь одинаковую или разную длину и/или последовательность в зависимости от структурных и/или функциональных особенностей sdAb и/или различных доменов. Каждый пептидный линкер можно выбрать и оптимизировать независимо. Длина, степень гибкости и или другие свойства пептидного линкера (-ов), примененного в CAR, могут оказывать определенное влияние на свойства, включая, но не ограничиваясь ими, аффинность, специфичность или avidность относительно одного или большего количества конкретных антигенов или эпитопов. Например, можно выбрать более длинные пептидные линкеры во избежание стерического несоответствия между двумя расположенными рядом доменами. Например, в мультивалентном или мультиспецифическом CAR по данному изобретению, который содержит sdAb, направленные против мультимерного антигена, длина и гибкость

пептидных линкеров предпочтительно таковы, что позволяет каждому sdAb в мультивалентном CAR связываться с антигенной детерминантой на каждой из субъединиц мультимера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения короткий пептидный линкер может быть расположен между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом CAR. В некотором варианте осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит гибкие остатки (такие как глицин и серин), так что расположенными рядом домены свободно перемещаются относительно друг друга. Например, глицин-сериновый дублет может быть пригодным пептидным линкером.

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер может иметь встречающуюся в природе последовательность или не встречающуюся в природе последовательность. Например, в качестве линкера можно применить последовательность, полученную из шарнирной области антител только с тяжелой цепью. См., например, WO1996/34103. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер является гибким линкером. Примеры гибких линкеров включают глициновые полимеры (G)_n, глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGS)_n, и (GGGGS)_n, где n представляет собой целое число, по меньшей мере, один), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGS (SEQ ID NO: 208), (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 209), (GGGS)₄

(SEQ ID NO: 210), GGGGSGGGGSGGGGGSGSGGGGS (SEQ ID NO: 211), GGGGSGGGGSGGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 212), (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 213), (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 214), или (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 215).

Трансмембранный домен

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

Трансмембранные домены классифицируются на основе трехмерной структуры трансмембранного домена. Например, трансмембранные домены могут образовывать альфа-спираль, комплекс из более чем одной альфа-спирали, бета-баррель или любую другую стабильную структуру, способную охватывать двойной фосфолипидный слой клетки. Кроме того, трансмембранные домены могут также или в альтернативном варианте классифицироваться на основе топологии трансмембранного домена, включая количество проходов, которые трансмембранный домен осуществляет через мембрану, и ориентацию белка. Например, однопроходные мембранные белки один раз пересекают клеточную мембрану, а многопроходные мембранные белки пересекают клеточную мембрану по меньшей мере дважды (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или большее количество раз). Мембранные белки могут быть определены как тип I, тип II или тип III в зависимости от топологии их концов и сегмента(ов), проходящих через мембрану, по отношению к внутренней и внешней поверхности клетки. Мембранные белки типа I имеют одну трансмембранную область и ориентированы так, что N-конец белка находится на внеклеточной стороне двойного липидного слоя клетки, а C-конец белка находится на цитоплазматической стороне. Мембранные белки типа II также имеют одну трансмембранную область, но они ориентированы так, что C-конец белка находится на внеклеточной стороне двойного липидного слоя клетки, а N-конец белка находится на цитоплазматической стороне. Мембранные белки типа III имеют множество

трансмембранных сегментов и могут быть дополнительно подклассифицированы на основе количества трансмембранных сегментов и расположения N- и C-концов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен CAR, описанный в данном документе, является производным от однопроходного мембранного белка типа I. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранные домены, являющиеся производными от многопроходных мембранных белков, также могут быть пригодными для применения в CAR, описанных в данном документе. Многопроходные мембранные белки могут содержать сложные (по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или большее количество) альфа-спирали или структуру бета-листа.

Предпочтительно, чтобы N-конец и C-конец многопроходного мембранного белка присутствовали на противоположных сторонах двойного липидного слоя, например, Nконец белка присутствует на цитоплазматической стороне двойного липидного слоя, а Cконец белка присутствует на внеклеточной стороне.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен CAR содержит трансмембранный домен, выбранный из группы, состоящей из трансмембранного домена альфа-, бета- или дзета-цепи рецептора T-клетки, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRK1), CD160, CD19, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R а, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, и/или NKG2C. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен является производным от молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен является производным от CD28. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен CD28 кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 203.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен является производным от CD8 α . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представляет собой трансмембранный домен CD8 α , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен CD8 кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 202.

Трансмембранные домены, пригодные для применения в CAR, описанных в данном документе, могут также содержать по меньшей мере часть сегмента синтетического, не встречающегося в природе белка. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен представляет собой синтетическую, не встречающуюся в природе альфа-спираль или бета-лист. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белковый сегмент составляет по меньшей мере около 20 аминокислот, например, по меньшей мере 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или большее количество аминокислот. Примеры синтетических трансмембранных доменов известны в данной области техники, например, описанные в патенте США № 7052906 В1 и публикации PCT № WO 2000/032776 А2, соответствующие описания которых включены в данный документ посредством ссылки.

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранная область трансмембранного домена содержит гидрофобные аминокислотные остатки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен CAR

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

Внутриклеточный сигнальный домен

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий по существу первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки. Термин "первичный внутриклеточный сигнальный домен" относится к цитоплазматической сигнальной

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен является производным от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен является цитоплазматическим сигнальным доменом дикого типа CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен дикого типа CD3 ζ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен является функциональным мутантом цитоплазматического сигнального домена CD3 ζ , содержащего одну или большее количество мутаций, таких как Q65K. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен мутантного CD3 ζ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 206 или 207.

Костимулирующий сигнальный домен

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит один костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит два или более (например, 2, 3, 4 и более) костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит два или более одинаковых костимулирующих сигнальных доменов, например, две копии костимулирующего сигнального домена CD28. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит два или большее количество костимулирующих сигнальных доменов из различных костимулирующих белков, таких как любые два или большее количество костимулирующих белков, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен (такой как цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ) и один или большее количество костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество костимулирующих сигнальных доменов и

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

Активация костимулирующего сигнального домена в клетке-хозяине (например, в иммунной клетке) может индуцировать клетку к повышению или снижению продукции и секреции цитокинов, фагоцитарные свойства, пролиферацию, дифференцировку, выживание и/или цитотоксичность. Костимулирующий сигнальный домен любой костимулирующей молекулы может быть совместим для применения в CAR, описанных в данном документе. Тип(ы) костимулирующего сигнального домена выбирают на основе таких факторов, как тип иммунных эффекторных клеток, в которых будут экспрессироваться эффекторные молекулы (например, Т-клетки, НК-клетки, макрофаги, нейтрофилы или эозинофилы), и желаемой иммунной эффекторной функции (например, эффект АКЦ). Примерами костимулирующих сигнальных доменов для применения в CAR могут быть цитоплазматический сигнальный домен костимулирующих белков, включая, без ограничения, представителей семейства B7/CD28 (например, B7-1/CD80, B72/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2/B7-DC, и PDCD6); представители суперсемейства TNF (например, 4-1BB/TNFSF9/CD137, 4-1BB лиганд/TNFSF9, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFF R/TNFRSF13C, CD27/TNFRSF7, CD27 лиганд/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, CD30 лиганд/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, CD40 лиганд/TNFSF5, DR3/TNFRSF25, GITR/TNFRSF18, GITR лиганд/TNFSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, лимфотоксин-альфа/TNF-бета, OX40/TNFRSF4, OX40 лиганд/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNFальфа, и TNF RII/TNFRSF1B); представители семейства SLAM (например, 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6, и SLAM/CD150); и любые другие стимулирующие молекулы, такие как CD2, CD7, CD53, CD82/Kai-1, CD90/Thy1, CD96,

CD160, CD200, CD300a/LMIR1, HLA Class I, HLA- DR, икарос, интегрин альфа 4/CD49d, интегрин альфа 4 бета 1, интегрин альфа 4 бета 7/LPAM1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP12, дектин-1/CLEC7A, DPPIV/CD26, EphB6, TIM1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TSLP, TSLP R, лимфоцитарный функциональный антиген-1 (LFA-1), а также NKG2C.

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен CAR по данному изобретению содержит костимулирующий сигнальный домен, производный от CD28. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 \square и костимулирующий сигнальный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен CD28 кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 204.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен CAR по данному изобретению содержит костимулирующий сигнальный домен, производный от CD137 (то есть, 4-1BB). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 \square и костимулирующий сигнальный домен CD137. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен CD137, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен CD137 кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен CAR по данному изобретению содержит костимулирующий сигнальный домен CD28 и костимулирующий сигнальный домен CD137. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 \square , костимулирующий сигнальный

домен CD28 и костимулирующий сигнальный домен CD137. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептид, содержащий от N-конца до С-конца: костимулирующий сигнальный домен CD28, костимулирующий сигнальный домен CD137 и цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен CD137, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196.

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

Шарнирная область

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

Шарнирный домен может содержать около 10-100 аминокислот, например, любое количество из 15-75 аминокислот, 20-50 аминокислот или 30-60 аминокислот. В

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен представляет собой шарнирный домен встречающегося в природе белка. Шарнирные домены любого белка, известные в данной области техники, включают шарнирный домен, являющийся пригодным для применения в описанных в данном документе химерных рецепторах. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен представляет собой, по меньшей мере, часть шарнирного домена встречающегося в природе белка и обеспечивает гибкость для химерного рецептора. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен является производным от CD8 α . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен представляет собой часть шарнирного домена CD8 α , например, фрагмент, содержащий по меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30, 35 или 40) последовательных аминокислот шарнирного домена CD8 α . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен CD8 α содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 192. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен CD8 α кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 201.

Шарнирные домены антител, таких как антитела IgG, IgA, IgM, IgE или IgD, также являются пригодными для применения в pH-зависимых химерных рецепторных системах, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен представляет собой шарнирный домен, который соединяет константные домены CH1 и CH2 антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен является доменом антитела и содержит шарнирный домен антитела и одну или большее количество константных областей антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен содержит шарнирный домен антитела и константную область CH3 антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен содержит шарнирный домен антитела и константные области CH2 и CH3 антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело представляет собой антитело IgG, IgA, IgM, IgE или IgD. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирная область содержит

шарнирную область и константные области CH2 и CH3 антитела IgG1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирная область содержит шарнирную область и константную область CH3 антитела IgG1.

Пептиды, не встречающиеся в природе, также могут применяться в качестве шарнирных доменов для химерных рецепторов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирный домен между Сконцом внеклеточного лигандсвязывающего домена Fc-рецептора и N-концом трансмембранного домена представляет собой пептидный линкер, такой как (GxS)_n линкер, где x и n независимо могут представлять собой целое число от 3 до 12, включая 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и более.

Сигнальный пептид

CAR по данному изобретению может содержать сигнальный пептид (также известный как сигнальная последовательность) на N-конце полипептида. Как правило, сигнальные пептиды представляют собой последовательности пептидов, которые нацеливают полипептид на необходимый участок в клетке. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид нацеливает эффекторную молекулу на секреторный путь клетки и обеспечивает интеграцию и закрепление эффекторной молекулы в двойном липидном слое. Сигнальные пептиды, включая сигнальные последовательности природных или синтетических белков, не встречающиеся в природе сигнальные последовательности, которые пригодны для применения в CAR, описанных в данном документе, будут знакомы специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид является производным от молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 α , ГМКСФ-рецептора и тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид является производным от CD8 α . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид CD8 α содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный пептид CD8 α кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 199 или 200.

IV. Сконструированные иммунные эффекторные клетки.

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

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая мультивалентный CAR, который содержит полипептид, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый ВСМА-связывающий фрагмент, специфически связывающийся с первым эпитопом ВСМА, и второй ВСМА-связывающий фрагмент, специфически связывающийся со вторым эпитопом ВСМА; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп отличается от второго эпитопа.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая мультивалентный CAR, который содержит полипептид, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое анти-ВСМА sdAb, специфически связывающееся с первым эпитопом ВСМА, и второе анти-ВСМА sdAb, специфически связывающееся со вторым эпитопом ВСМА; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп и второй эпитоп отличаются. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-ВСМА sdAb и/или второе анти-ВСМА sdAb является верблюжьим, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первое анти-ВСМА и второе анти-ВСМА являются слитыми друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 (например, не более чем около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен выбирают из группы, состоящей из CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (например, Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен является производным от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен является производным от костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного

изобретения мультивалентный CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 α), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мультивалентный CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 α), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид содержит от N-конца до С-конца: сигнальный пептид CD8 α , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD8 α , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая ВСМА CAR, который содержит полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-ВСМА sdAb; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом анти-ВСМА sdAb содержит любой из следующих элементов: (1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77; (2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78; (3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79; (4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; (5) CDR1, содержащую аминокислотную

изобретения внеклеточный антигенсвязывающий домен сордержит по меньшей мере два анти-BCMA sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблужьим, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит домен $V_{\text{H}}\text{H}$, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115-152. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (например, Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный внутриклеточный сигнальный домен является производным от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий сигнальный домен является производным от костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 α), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 α), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид содержит от N-конца до С-конца: сигнальный пептид CD8 α , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, производный от CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, производный от CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, производный от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид содержит от N-конца до С-конца: сигнальный пептид CD8 α , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD8 α , костимулирующий сигнальный домен, производный от CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, производный от CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 216-256, 298-335. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку,

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

В данном изобретении также предлагаются сконструированные иммунные эффекторные клетки, содержащие (или экспрессирующие) два или большее количество различных CAR. Любые два или большее количество из CAR, описанных в данном документе, могут экспрессироваться в комбинации. CAR могут нацеливаться на различные антигены, тем самым обеспечивая синергические или аддитивные эффекты. Поскольку однодоменные антитела во внеклеточных антигенсвязывающих доменах CAR имеют только отдельные переменные цепи антигена (например, тяжелые цепи), такие CAR-экспрессирующие клетки не имеют проблем с ошибочным спариванием переменных цепей, что продемонстрировано в сконструированных иммунных эффекторных клетках, коэкспрессирующих два или большее количество CAR на основе scFv. Типовые сконструированные иммунные эффекторные клетки, коэкспрессирующие два CAR на основе VHH, проиллюстрированы на ФИГ. 15E. Специалисту в данной области техники будет понятно, что CAR на основе других sdAb или имеющие другие структуры, как описано в данном документе, могут быть коэкспрессированы в сконструированных иммунных эффекторных клетках. два или большее количество CAR могут быть закодированы на одном и том же векторе или на разных векторах.

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

Векторы

В одном аспекте данного изобретения предлагаются векторы для клонирования и экспрессии любого одного из CAR, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор является пригодным для репликации и интеграции в эукариотических клетках, таких как клетки млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой вирусный вектор. Примеры векторов включают, но не ограничиваются ими,

аденовирусные векторы, адено-ассоциированные вирусные векторы, лентивирусный вектор, ретровирусные векторы, вектор вируса осповакцины, герпесвирусный вектор и их производные. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в руководстве Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии.

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой невирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой транспозон, такой как транспозоновая система «Спящая красавица» (SB), или транспозоновая система PiggyBac. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой невирусный вектор на основе полимера, включая, например, поли (молочно-ко-гликолевую кислоту) (PLGA) и

полимолочную кислоту (PLA), поли(этилен-имин) (PEI) и дендримеры. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой невирусный вектор на основе катион-липидов, такой как катионная липосома, липидная наноэмульсия и твердая липидная наночастица (SLN). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой невирусный вектор на основе пептида, такого как поли-L-лизин. Любой из известных невирусных векторов, пригодных для редактирования генома, можно применять для введения нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, в сконструированные иммунные эффекторные клетки. См., например, Yin H. et al. *Nature Rev. Genetics* (2014) 15: 521-555; Aronovich EL et al. "The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy." *Hum. Mol. Genet.* (2011) R1: R14-20; и Zhao S. et al. "PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene editing." *Transl. Lung Cancer Res.* (2016) 5(1): 120-125, что включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения любую одну или большее количество нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, вводят в сконструированные иммунные эффекторные клетки физическим методом, включая, но не ограничиваясь этим, электропорацию, ультразвуковую порацию, фотопорацию, магнитофекцию, гидропорацию.

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, является функционально связанной с конститутивным промотором. Конститутивные промоторы позволяют гетерологичным генам (также называемым трансгенами) конститутивно экспрессироваться в клетках-хозяевах. Типовые конститутивные промоторы, рассматриваемые в данном документе, включают в себя, но не ограничиваются ими, промоторы цитомегаловируса (CMV), факторы элонгации-1 α

человека (hEF1 α), промотор убиквитина С (UbiC), промотор фосфоглицерокиназы (PGK), ранний промотор вируса 40 обезьян (SV40) и промотор β -актина кур в сочетании с ранним энхансером CMV (CAGG). Эффективность таких конститутивных промоторов на стимулирование трансгенной экспрессии детально сравнивалась во множестве исследований. Например, Michael C. Milone et al сравнивал эффективность CMV, hEF1 α , UbiC и PGK с целью стимулирования экспрессии CAR в первичных Т-клетках человека и пришел к выводу, что промотор hEF1 α не только индуцировал самый высокий уровень экспрессии трансгена, но также оптимально поддерживался в Т клетках CD4 и CD8 человека (Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009)). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, является функционально связанной с промотором hEF1 α .

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

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

промоторы, пригодные для регуляции экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор содержит более чем одну нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность первой нуклеиновой кислоты, кодирующую первый CAR, и последовательность второй нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CAR, при этом первая нуклеиновая кислота является функционально связанной со второй нуклеиновой кислотой посредством последовательности третьей нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения саморасщепляющийся пептид выбирают из группы, состоящей из T2A, P2A и F2A. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептид T2A имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 385.

Иммунные эффекторнeе клетки

"Иммунные эффекторнeе клетки" представляют собой иммунные клетки, которые могут выполнять иммунные эффекторнeе функции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммунные эффекторнeе клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и выполняют эффекторнeе функцию АЗКЦ. Примеры иммунных эффекторнeе клеток, которые опосредуют АЗКЦ, включают в себя мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы, а также эозинофилы.

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

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

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

Сконструированные иммунные эффекторнeе клетки получают путем введения CAR в иммунные эффекторнeе клетки, такие как Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR вводят в иммунные эффекторнeе клетки путем трансфекции любой из выделенных нуклеиновых кислот или любого из векторов, описанных в разделе III. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR вводят в иммунные эффекторнeе клетки путем введения белков в клеточную мембрану при прохождении клеток через микрожидкостную систему, такую как CELL SQUEEZE[®] (см., например, публикацию заявки на патент США №20140287509).

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения молекулы РНК, кодирующие любой из CAR, описанных в данном документе, могут быть получены с помощью обычных способов (например, с помощью транскрипции *in vitro*), а затем введены в иммунные эффекторный клетки с помощью известных способов, таких как электропорация мРНК. См, например, Rabinovich et al., Human Gene Therapy 17: 10271035.

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

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

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

1. Источники T-клеток

До размножения и генетической модификации Т-клеток источник Т-клеток получают от индивидуума. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из участка инфекции, асцитическую жидкость, плевральный выпот, ткань селезенки, а также опухоли. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения можно применять любое количество линий Т-клеток, доступных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки можно получить из образца крови, собранной у субъекта, с помощью любого количества методов, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение FICOLL™. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки из циркулирующей крови индивидуума получают путем афереза. Как правило, продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки, полученные с помощью афереза, можно промыть для удаления фракции плазмы и поместить клетки в соответствующий буфер или среду для проведения последующих этапов обработки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки промывают физиологическим раствором, забуференным фосфатом (PBS). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в промывочном растворе отсутствует кальций и может отсутствовать магний или могут отсутствовать многие, если не все, двухвалентные катионы. Кроме того, неожиданно было обнаружено, что на начальных этапах активации в отсутствие кальция наблюдается усиленная активация. Специалистам в данной области техники будет четко понятно, что этап промывки можно выполнить с помощью способов, известных специалистам в данной области техники, таких как применение полуавтоматической "проточной" центрифуги (например, устройство для обработки клеток Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5) согласно инструкциям производителя. После промывания клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах, таких как, например, PBS, не содержащий Ca^{2+} , Mg^{2+} PlasmaLyte A или другой солевой раствор с буфером или без него. В альтернативном варианте нежелательные компоненты образца афереза можно удалить, а клетки непосредственно ресуспендировать в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови путем лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например, с помощью центрифугирования посредством градиента PERCOLL™ или

противоточного элютриационного центрифугирования. Кроме того, специфическую субпопуляцию Т-клеток, такую как CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и CD45RO+ Тклетки, можно выделить с помощью сортировки путем положительного или отрицательного отбора. Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки выделяют путем инкубации с анти-CD3/анти-CD28 (то есть, 3×28)конъюгированных гранул, таких как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 Т, в течение периода времени, достаточного для положительного отбора необходимых Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения период времени составляет около 30 минут. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения период времени составляет от 30 минут до 36 часов или дольше и включает все целые значения между ними. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения период времени составляет от 10 до 24 часов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения период инкубации составляет 24 часа. При выделении Т-клеток у пациентов с лейкозом применение более длительных периодов инкубации, например, 24 часа, может увеличить количество получаемых клеток. Более длительное время инкубации можно применять для выделения Т-клеток в том случае, когда имеется небольшое количество Т-клеток по сравнению с другими типами клеток, например, при выделении инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) из опухолевой ткани или у индивидуумов с ослабленным иммунитетом. Кроме того, применение более длительных периодов инкубации может повысить эффективность захвата CD8+ Т-клеток. Таким образом, путем простого укорачивания или удлинения периода времени, в течение которого Т-клетки могут связываться с гранулами CD3/CD28, и/или путем увеличения или уменьшения отношения гранул к Т-клеткам (как описано далее в данном документе), субпопуляции Т-клеток могут быть предпочтительно выбраны во время или вплотную по времени к закладке культуры или в другие моменты времени во время процесса. Кроме того, путем увеличения или уменьшения отношения антител антиCD3 и/или анти-CD28 на гранулах или другой поверхности, субпопуляции Т-клеток могут быть предпочтительно выбраны во время или вплотную по времени к закладке культуры или в других желаемых моментах времени. Специалисту в данной области техники будет понятно, что можно применять несколько циклов отбора. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть желательным выполнить процедуру селекции и применять "неотоборанные" клетки в процессе активации и

размножения. "Неотобранные" клетки также могут быть подвергнуты дальнейшим циклам отбора.

Обогащение популяции Т-клеток путем отрицательного отбора можно выполнить с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отобранных клеток. Один из способов представляет собой сортировку и/или отбор клеток с помощью отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которой применяется смесь из моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на клетках, выбранных отрицательно. Например, чтобы обогатить CD4⁺ клетки путем отрицательного отбора, смесь моноклональных антител, как правило, включает в себя антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть желательным обогащать или положительно отбирать регуляторные Т-клетки, которые обычно экспрессируют CD4⁺, CD25⁺, CD62Lhi, GITR⁺ и FoxP3⁺. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения Регуляторные клетки истощают с помощью анти-С25-конъюгированных гранул или других подобных методов отбора.

Для выделения желаемой популяции клеток путем положительного или отрицательного отбора концентрация клеток и поверхность (например, частицы, такие как гранулы) могут быть изменены. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть желательным значительное уменьшение объема, в котором гранулы и клетки смешиваются вместе (то есть, увеличение концентрации клеток), с целью обеспечения максимального контакта клеток и гранул. Например, в одном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию 2 миллиарда клеток/мл. В одном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию более 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения можно применять концентрацию, составляющую 125 или 150 миллионов клеток/мл. Применение высоких концентраций может привести к увеличению количества полученных клеток, активации и размножению клеток. Кроме того, применение высоких концентраций клеток позволяет более эффективно захватывать клетки, которые могут слабо экспрессировать

антигены-мишени, представляющие интерес, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или клетки из образцов, в которых присутствует много опухолевых клеток (то есть, лейкозная кровь, опухолевая ткань и т. д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность и являются желательными для получения. Например, применение высокой концентрации клеток позволяет более эффективно отбирать CD8+ Тклетки, которые обычно характеризуются более низким уровнем экспрессии CD28.

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

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

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

интенсивностью 1° в минуту и хранят в паровой фазе резервуара для хранения жидкого азота. Можно применять и другие методы контролируемого замораживания, а также неконтролируемое мгновенное замораживание при t минус 20 °C или в жидком азоте.

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

В данном изобретении также рассматривается сбор образцов крови или продукта афереза у субъекта в период времени до того, когда могут понадобиться размноженные клетки, как описано в данном документе. Таким образом, клетки, подлежащие размножению, можно собрать из их источника получения в любой необходимый момент времени, при этом желаемые клетки, такие как Т-клетки будут выделяться и замораживаться для последующего применения с целью Т-клеточной терапии ряда заболеваний или патологических состояний, при которых будет эффективна Т-клеточная терапия, такая как описанная в данном документе. В одном варианте осуществления данного изобретения образец крови или афереза получают от в целом здорового субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образец крови или афереза получают от в целом здорового субъекта, который подвержен риску развития заболевания, но у которого заболевание еще не развилось, при этом клетки, представляющие интерес, выделяют и замораживают для последующего применения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки можно размножить, заморозить и применять позднее. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образцы собирают у пациента вскоре после установления диагноза конкретного заболевания, как описано в данном документе, но до применения любого вида лечения. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения клетки выделяют из образца крови или афереза у субъекта до применения любого количества соответствующих способов лечения, включая, но не ограничиваясь ими, лечение такими агентами, как натализумаб, эфализумаб, противовирусные агенты, химиотерапию, радиационное облучение, иммуносупрессивные агенты, такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антитела или другие иммуноаблативные агенты, такие как САМРАТН, антитела анти-CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофенольная кислота, стероиды, FR901228, а также лучевая обработка. Эти препараты ингибируют кальциневрин кальцийзависимую фосфатазу (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназу p70S6, что важно для передачи сигналов, индуцированных фактором роста (рапамицин) (Liu et al., Cell 66: 807-815, 1991; Henderson et al., Immun 73: 316-321,

1991; Bierer et al., *Curr. Opin. Immun.* 5: 763-773, 1993). В дополнительном варианте осуществления данного изобретения клетки выделяют от пациента и замораживают для последующего применения в сочетании с (например, до, одновременно или после) трансплантацией костного мозга или стволовых клеток, Тклеточной абляционной терапией с применением либо химиотерапевтических агентов, таких как флударабин, наружной дистанционной лучевой терапии (XRT), циклофосфида, либо антител, таких как ОКТ3 или CAMPATH. В другом варианте осуществления данного изобретения клетки могут быть заранее выделены и заморожены для последующего применения с целью лечения после В-клеточной абляционной терапии с применением таких агентов, которые реагируют с CD20, например, ритуксан.

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

2. Активация и размножение Т-клеток

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

5883223; 6905874; 6797514; 6867041; ив публикации заявки на патент США № 20060121005.

Как правило, Т-клетки можно размножить путем контакта с поверхностью с прикрепленным к ней агентом, который стимулирует сигнал, ассоциированный с комплексом CD3/TCR, и лигандом, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток можно стимулировать, как описано в данном документе, например, путем приведения в контакт с антителом антиCD3 или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом анти-CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем приведения в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с ионофором кальция. Для костимуляции дополнительной молекулы на поверхности Т-клеток применяется лиганд, который связывает дополнительную молекулу. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом анти-CD3 и антителом анти-CD28 в условиях, пригодных для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации либо CD4+ Т-клеток, либо CD8+ Т-клеток, антитела анти-CD3 и антитела анти-CD28. Можно применять антитела анти-CD28, примеры которых включают в себя 9. 3, В-Т3, XR-CD28 (Diaclone, Безансон, Франция), как и другие известные в данной области техники способы (Berg et al., *Transplant Proc.* 30 (8): 3975-3977, 1998. Naanen et al., *J. Exp. Med.* 190 (9): 13191328, 1999; Garland et al., *J. Immunol Meth.* 227(1-2): 53-63, 1999).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичный стимулирующий сигнал и костимулирующий сигнал для Т-клетки можно получить с помощью различных протоколов. Например, агенты, обеспечивающие каждый сигнал, могут находиться в растворе или быть соединены с поверхностью. При соединении с поверхностью агенты могут быть соединены с одной и той же поверхностью (то есть в форме "цис") или с отдельными поверхностями (то есть в форме "транс"). В альтернативном варианте один агент может быть связан с поверхностью и с другим агентом в растворе. В одном варианте осуществления данного изобретения агент, обеспечивающий костимулирующий сигнал, связан с поверхностью клетки, а агент, обеспечивающий первичный активирующий сигнал, находится в растворе или соединен с поверхностью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения оба агента могут находиться в растворе. В другом варианте осуществления данного изобретения агенты могут находиться в растворимой форме, а затем поперечно сшиты с поверхностью, такой как клетка, экспрессирующая Fc-рецепторы, или антитело или другой связывающий агент, который будет связываться с агентами. В этой связи, см., например, публикации

заявок на патенты США №№ 20040101519 и 20060034810 для искусственных антигенпредставляющих клеток (аAPC), которые предназначены для применения с целью активации и размножения Т-клеток в данном изобретении.

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

В качестве примера белки клеточной поверхности можно лигировать, обеспечив контакт парамагнитных гранул, к которым прикреплены анти-CD3 и анти-CD28 (3×28 гранул), с Т-клетками. В одном варианте осуществления данного изобретения клетки (например, от 10^4 до 10^9 Т-клеток) и гранулы (например, парамагнитные гранулы DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 Т в соотношении 1:1) комбинируют в буфер, предпочтительно PBS (без двухвалентных катионов, таких как кальций и магний). Как и в предыдущем случае, специалисты в данной области техники могут легко оценить, какую концентрацию клеток можно применять. Например, клетка-мишень может очень редко встречаться в образце и составлять только 0,01 % образца, или весь образец (то есть 100 %) может содержать клетку-мишень, представляющую интерес. Соответственно, для данного изобретения можно применять любое количество клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть желательным значительное уменьшение объема, в котором частицы и клетки смешиваются вместе (т. е. увеличение концентрации клеток), с целью обеспечения максимального контакта клеток и частиц. Например, в одном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию около 2 миллиардов клеток/мл. В другом варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию более 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном варианте осуществления данного изобретения применяют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения можно применять концентрацию, составляющую 125 или 150 миллионов клеток/мл. Применение высоких концентраций может привести к увеличению количества полученных клеток,

активации и размножению клеток. Кроме того, применение высоких концентраций клеток позволяет более эффективно захватывать клетки, которые могут слабо экспрессировать антигены-мишени, представляющие интерес, такие как CD28-отрицательные Т-клетки. Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность и являются желательными для получения в некоторых вариантах осуществления данного изобретения. Например, применение высокой концентрации клеток позволяет более эффективно отбирать CD8⁺ Т-клетки, которые обычно характеризуются более низким уровнем экспрессии CD28.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения смесь можно культивировать в течение нескольких часов (около 3 часов) до около 14 дней или любого целого значения часа между ними. В другом варианте осуществления данного изобретения смесь можно культивировать в течение 21 дня. В одном варианте осуществления данного изобретения гранулы и Т-клетки культивируют вместе в течение около восьми дней. В другом варианте осуществления данного изобретения гранулы и Т-клетки культивируют вместе в течение 2-3 дней. Также могут потребоваться несколько циклов стимуляции, в результате чего время культивирования Т-клеток может составлять 60 дней или более. Условия, подходящие для культивирования Т-клеток, включают подходящую среду (например, минимальную основную среду или среду RPMI Media 1640 или X-vivo 15 (Lonza)), которые могут содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, (IL-2), инсулин, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β и TNF- α или любые другие добавки для роста клеток, известных специалисту в данной области техники. Другие добавки для роста клеток включают в себя, но не ограничиваются ими, поверхностно-активное вещество, плазматат и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среда может включать в себя RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, Optimizer, с добавленными аминокислотами, пируватом натрия и витаминами, без сыворотки или с добавлением соответствующего количества сыворотки (или плазмы) или определенного набора гормонов и/или количества цитокина (ов), достаточного для роста и размножения Т-клеток. Антибиотики например, пенициллин и стрептомицин, включены только в экспериментальные культуры, а не в культуры клеток, которые предназначены для введения субъекту. Клетки-мишени выдерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, например, при соответствующей температуре (например, 37 °C) и в соответствующей атмосфере (например, воздух плюс 5% CO₂). Т-клетки, подвергшиеся воздействию стимуляции в течение различных периодов времени, могут обладать разными

характеристиками. Например, типичные продукты крови или мононуклеарных клеток периферической крови, полученные в результате афереза, имеют популяцию хелперных Т-клеток (ТН, CD4 +), которая является более численной, чем популяция цитотоксических или супрессорных Т-клеток (ТС, CD8). Размножение Т-клеток *Ex vivo* в результате стимуляции рецепторов CD3 и CD28 приводит к продуцированию популяции Т-клеток, которые до примерно 8-9 дней состоят преимущественно из ТН-клеток, тогда как примерно через 8-9 дней популяция Т-клеток включает в себя все более многочисленную популяцию ТС-клеток. Соответственно, в зависимости от цели лечения, может быть предпочтительным введение субъекту популяции Т-клеток, включающей преимущественно ТН-клетки. Аналогичным образом, если выделено антигенспецифическое подмножество ТС-клеток, может быть полезно размножить это подмножество до большей степени.

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

V. Фармацевтические композиции

Кроме того, в данной заявке предлагаются фармацевтические композиции, содержащие любое одно из однодоменных антител анти-BCMA или любую из сконструированных иммунных эффекторных клеток, содержащих любой из CAR (таких как BCMA CAR), как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции можно получить путем смешивания sdAb или множества сконструированных иммунных эффекторных клеток, обладающих желаемой степенью чистоты, необязательно, в сочетании с фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. (1980)), в виде лиофилизированных препаратов или водных растворов.

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

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

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

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

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

мионизитол, галактоза, галактит, глицерин, циклитолы (например, инозит), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстановители, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, α -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; белки с низкой молекулярной массой, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или другие иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды (например, ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза, дисахариды (например, лактоза, мальтоза, сахароза), трисахариды, такие как раффиноза и полисахариды, такие как декстрин или декстран.

Неионные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как "смачивающие агенты") содержатся для облегчения солюбилизации терапевтического агента, а также защиты терапевтического белка от агрегации, вызванной перемешиванием, что также позволяет составу подвергаться напряжению поверхности сдвига без иницирования денатурации активного терапевтического белка или антитела. Неионные поверхностно-активные вещества содержатся в диапазоне от около 0,05 мг/мл до около 1,0 мг/мл, предпочтительно от около 0,07 мг/мл до около 0,2 мг/мл.

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

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

Путь введения соответствует известным и принятым способам, например, однократное или множественное введение болюсной дозы или инфузия в течение длительного периода времени подходящим путем, например, инъекция или инфузия с помощью подкожного, внутривенного, внутрибрюшинного, внутримышечного,

внутриартериального, внутриочагового или внутрисуставного пути, местное введение, ингаляция или введение с замедленным высвобождением или пролонгированным высвобождением.

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

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

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

VI. Способы лечения

Данное изобретение относится к способам и композициям для применения в клеточной иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клеточная иммунотерапия предназначена для лечения рака, включая, но не ограничиваясь этим, гематологические злокачественные опухоли и солидные опухоли. Любые

антиBCMA sdAb, CAR и сконструированные иммунные эффекторные клетки (такие как CART-клетки), описанные в данном изобретении, можно применять в способе лечения рака. Описанные в данном документе CAR могут быть пригодны для лечения опухолей, характеризующихся мутациями, которые обуславливают продуцирование исчезнувших вариантов антигена, а также для снижения резистентности к существующим способам лечения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения способы и композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения других заболеваний, которые ассоциированы с антигенами, специфически распознаваемыми однодоменными антителами или CAR, включая, например, аутоиммунные заболевания.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака (такого как множественная миелома, например, рецидивирующая или рефрактерная множественная миелома) у индивидуума (например, у человека/индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую мультивалентный CAR, который содержит полипептид, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый BCMA-связывающий фрагмент, специфически связывающийся с первым эпитопом BCMA, и второй BCMA-связывающий фрагмент, специфически связывающийся со вторым эпитопом BCMA; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп отличается от второго эпитопа; а также (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака (такого как множественная миелома, например, рецидивирующая или рефрактерная множественная миелома) у индивидуума (например, у человека-индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую мультивалентный CAR, который содержит полипептид, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое анти-BCMA sdAb, специфически связывающееся с первым эпитопом BCMA, и второе анти-BCMA sdAb, специфически связывающееся со вторым эпитопом BCMA; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп и второй эпитоп отличаются; а также (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения

сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированные иммунные эффекторные клетки являются CAR-T клетками. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз, такой как множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой рефрактерную или рецидивирующую множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированную иммунную эффекторную клетку вводят в дозе от около 10^5 до около 10^7 клеток/кг, например, от около 3×10^5 до около 7×10^6 клеток/кг или около 3×10^6 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированную иммунную эффекторную клетку вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированную иммунную эффекторную клетку вводят в трех дробных дозах в течение около недели.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака (такого как множественная миелома, например, рецидивирующая или рефрактерная множественная миелома) у индивидуума (например, у человека/индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую BCMA CAR, который содержит полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, и (2) фармацевтически приемлемый носитель, при этом анти-BCMA sdAb содержит любой из следующих элементов: (1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77; (2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78; (3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79; (4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; и CDR3, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внеклеточный антигенсвязывающий домен сордержит по меньшей мере два анти-BCMA sdAb. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антиBCMA sdAb является верблужим, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит домен $V_{\text{H}}\text{H}$, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115-152. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения BCMA CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 216-256 и 298-335. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз, такой как множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой рефрактерную или рецидивирующую множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированную иммунную эффекторную клетку вводят в дозе от около 10^5 до около 10^7 клеток/кг, например, от около 3×10^5 до около 7×10^6 клеток/кг или около 3×10^6 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированную иммунную эффекторную клетку вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированную иммунную эффекторную клетку вводят в трех дробных дозах в течение около недели.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ получения частичной или полной клинической ремиссии у индивидуума, имеющего множественную миелому (например, рецидивирующую или рефрактерную множественную миелому), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую мультивалентный CAR, который содержит полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый BCMA-связывающий фрагмент (такой как первое анти-BCMA sdAb), специфически связывающийся с первым эпитопом BCMA, и второй BCMA-связывающий фрагмент (такой как второе анти-BCMA sdAb), специфически связывающийся со вторым эпитопом BCMA; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен,

при этом первый эпитоп и второй эпитоп отличаются; а также (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированные иммунные эффекторные клетки являются CAR-T клетками. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз, такой как множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой рефрактерную или рецидивирующую множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированную иммунную эффекторную клетку вводят в дозе от около 10^5 до около 10^7 клеток/кг, например, от около 3×10^5 до около 7×10^6 клеток/кг или около 3×10^6 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированную иммунную эффекторную клетку вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированную иммунную эффекторную клетку вводят в трех дробных дозах в течение около недели.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения рака (такого как множественная миелома, например, рецидивирующая или рефрактерная множественная миелома) у индивидуума (например, у человека/индивидуума), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей анти-BCMA sdAb и фармацевтически приемлемый носитель, при этом анти-BCMA sdAb содержит любой элемент из следующих: (1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77; (2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78; (3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79; (4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; CDR2, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 76; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb является верблюжьим, химерным, человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-BCMA sdAb содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115-152. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой гемобластоз, такой как множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой рефрактерную или рецидивирующую множественную миелому.

Способы, описанные в данном документе, пригодны для лечения различных видов рака, включая как солидный рак, так и гемобластозы. Способы применимы к ракам всех стадий, включая раннюю стадию, позднюю стадию и метастатический рак. Способы, описанные в данном документе, можно применять в качестве первой линии терапии, второй линии терапии, третьей линии терапии или комбинированной терапии с другими способами лечения рака, известными в данной области техники, такими как химиотерапия, хирургическое лечение, облучение, генная терапия, иммунотерапия, трансплантация костного мозга, трансплантация стволовых клеток, таргетная терапия, криотерапия, ультразвуковая терапия, фотодинамическая терапия, радиочастотная абляция или тому подобное, в режиме адьювантного или неоадьювантного лечения.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой множественную миелому стадии I, стадии II или стадии III и/или стадии A или стадии B на основе системы стадирования по ДьюриСэлмону (Durie-Salmon). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой множественную миелому стадии I, стадии II или стадии III на основе Международной системы стадирования, опубликованной Международной рабочей группой по изучению миеломы (IMWG). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой моноклональную гаммапатию неясного генеза (MGUS). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой бессимптомную (вялотекущую/невыраженную) миелому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак проявляется клинически или представляет собой активную миелому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой рефрактерную

множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой метастатическую множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум не отвечал на предыдущее лечение множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум имеет прогрессирующее заболевание после предыдущего лечения множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум ранее получил по меньшей мере 2, 3, 4 или большее количество курсов лечения множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак представляет собой рецидивирующую множественную миелому.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум имеет активную множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения у индивидуума определяется по меньшей мере 10 % клональных плазменных клеток костного мозга. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения у индивидуума есть подтверждённая биопсией плазмоцитомы костного мозга или экстрамедуллярная плазмоцитома. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум имеет признаки поражения органов-мишеней, что может быть связано с основным пролиферативным нарушением плазматических клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум имеет гиперкальцемию, например, кальций сыворотки более 0,25 ммоль/л (более 1 мг/дл) выше, чем верхняя граница нормы или более 2,75 ммоль/л (более 11 мг/дл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум имеет почечную недостаточность, например, клиренс креатинина менее 40 мл в минуту или креатинин сыворотки более 177 мкмоль/л (более 2 мг/дл). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум имеет анемию, например, значение гемоглобина более 20 г/л ниже нижней границы нормы, или значение гемоглобина менее 100 г/л. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум имеет одно или большее количество поражений костей, например одно или большее количество остеолитических поражений, подтвержденных радиографией костей, КТ или ПЭТ/КТ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индивидуум имеет одно или большее количество из следующих биомаркеров злокачественности (MDE): (1) 60 % или более клональных плазменных клеток при исследовании костного мозга; (2) отношение сывороточных свободных вовлеченных легких цепей к невовлеченным, равное 100 или более, при условии, что абсолютный уровень вовлеченной легкой цепи составляет по меньшей мере

100 мг/л; и (3) более одного очагового поражения на МРТ размером по меньшей мере 5 мм или больше.

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

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, в которых фармацевтическая композиция содержит любое sdAb, описанное в данном документе,

указанную фармацевтическую композицию вводят в дозе от около 10 нг/кг до около 100 мг/кг веса тела индивидуума или более в сутки, например, от около 1 мг/кг/сут до 10 мг/кг/сут, в зависимости от пути введения. Рекомендации по конкретным дозам и способам доставки представлены в литературе; см., например, в патентах США № 4657760; 5206344; или 5225212.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, в которых фармацевтическая композиция содержит любую из сконструированных иммунных клеток, описанных в данном документе, указанную фармацевтическую композицию вводят в дозе по меньшей мере около 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 или 10^9 клеток/кг веса тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтическую композицию вводят в дозе по меньшей мере от около 10^4 до около 10^5 , от около 10^5 до около 10^6 , от около 10^6 до около 10^7 , от около 10^7 до около 10^8 , от около 10^8 до около 10^9 , от около 10^4 до около 10^9 , от около 10^4 до около 10^6 , от около 10^6 до около 10^8 , от от около 10^5 до около 10^7 клеток/кг веса тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтическую композицию вводят в дозе по меньшей мере около 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 клеток/кг или больше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтическую композицию вводят в дозе, составляющей от около 3×10^5 до около 7×10^6 клеток/кг, или около 3×10^6 клеток/кг.

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

Кроме того, дозы можно вводить посредством одного или большего количества дробных введений или путем непрерывной инфузии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтическую композицию вводят в дробных дозах, например, в около 2, 3, 4, 5 или большем количестве доз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения дробные дозы вводят в течение около недели. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения доза разделяют на одинаковые части. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения дробные дозы составляют около 20 %, около 30 % и около 50 % от общей дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения интервал между последовательными дробными дозами составляет около 1 дня, 2 дней, 3 дней или дольше. При повторном введении в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от патологического состояния, лечение продолжают до желаемого подавления симптомов заболевания. Однако можно применять и другие схемы введения доз. Эффективность лечения можно контролировать с помощью обычных методик и анализов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения количество фармацевтической композиции является эффективным для получения объективного клинического ответа у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ получения объективного клинического ответа у индивидуума, имеющего множественную миелому (например, рецидивирующую или рефрактерную множественную миелому), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую мультивалентный CAR, который содержит полипептид, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый ВСМА-связывающий фрагмент (такой как первое анти-ВСМА sdAb), специфически связывающийся с первым эпитопом ВСМА, и второй ВСМА-связывающий фрагмент (такой как второе анти-ВСМА sdAb), специфически связывающийся со вторым эпитопом ВСМА; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп и второй эпитоп отличаются; а также (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения у индивидуума получают строгий клинический ответ (сКО).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения количество фармацевтической композиции является эффективным, чтобы вызвать ремиссию заболевания (частичную или полную) у индивидуума. В некоторых вариантах

осуществления данного изобретения предлагается способ получения ремиссии заболевания (частичной или полной) у индивидуума, имеющего множественную миелому (например, рецидивирующую или рефрактерную множественную миелому), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Тклетка), содержащую мультивалентный CAR, который содержит полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый ВСМАсвязывающий фрагмент (такой как первое анти-ВСМА sdAb), специфически связывающийся с первым эпитопом ВСМА, и второй ВСМА-связывающий фрагмент (такой как второе анти-ВСМА sdAb), специфически связывающийся со вторым эпитопом ВСМА; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп и второй эпитоп отличаются; а также (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клиническая ремиссия возникает не более чем через около 6 месяцев, 5 месяцев, 4 месяцев, 3 месяцев, 2 месяцев, 1 месяца или раньше после получения индивидуумом фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения количество фармацевтической композиции является эффективным для предотвращения рецидива или прогрессирования рака у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ предотвращения рецидива или прогрессирования заболевания у индивидуума, имеющего множественную миелому (например, рецидивирующую или рефрактерную множественную миелому), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую мультивалентный CAR, который содержит полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый ВСМА-связывающий фрагмент (такой как первое анти-ВСМА sdAb), специфически связывающийся с первым эпитопом ВСМА, и второй ВСМА-связывающий фрагмент (такой как второе анти-ВСМА sdAb), специфически связывающийся со вторым эпитопом ВСМА; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп и второй эпитоп отличаются; а также (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рецидив или прогрессирование заболевания предотвращается на период по меньшей мере около 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет и более.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения количество фармацевтической композиции является эффективным для продления выживаемости (например, безрецидивной выживаемости) у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выживаемость продлевается на период по меньшей мере около 2, 3, 4, 5, 6, 12 или 24 месяцев. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ продления выживаемости у индивидуума, имеющего множественную миелому (например, рецидивирующую или рефрактерную множественную миелому), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую мультивалентный CAR, который содержит полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый ВСМА-связывающий фрагмент (такой как первое анти-ВСМА sdAb), специфически связывающийся с первым эпитопом ВСМА, и второй ВСМА-связывающий фрагмент (такой как второе анти-ВСМА sdAb), специфически связывающийся со вторым эпитопом ВСМА; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп и второй эпитоп отличаются; а также (2) фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтическая композиция является эффективной для улучшения качества жизни индивидуума. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ улучшения качества жизни индивидуума, имеющего множественную миелому (например, рецидивирующую или рефрактерную множественную миелому), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую мультивалентный CAR, который содержит полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый ВСМА-связывающий фрагмент (такой как первое анти-ВСМА sdAb), специфически связывающийся с первым эпитопом ВСМА, и второй ВСМА-связывающий фрагмент (такой как второе анти-ВСМА sdAb), специфически связывающийся со вторым эпитопом ВСМА; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп и второй эпитоп отличаются; а также (2) фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения количество фармацевтической композиции является эффективным для ингибирования роста или уменьшения размера солидной или лимфатической опухоли. В некоторых вариантах

осуществления данного изобретения размер солидной или лимфатической опухоли уменьшается по меньшей мере на 10 % (включая, например, по меньшей мере около 20 %, 30 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % или 100 %). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ ингибирования роста или уменьшения размера солидной или лимфатической опухоли у индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения количество фармацевтической композиции является эффективным для ингибирования метастазирования опухоли у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения метастазирование ингибируется по меньшей мере на 10 % (включая, например, по меньшей мере около 20 %, 30 %, 40 %, 60% , 70 %, 80 %, 90 % или 100 %). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ ингибирования метастазирования опухоли у индивидуума, имеющего множественную миелому (например, рецидивирующую или рефрактерную множественную миелому), включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей: (1) сконструированную иммунную эффекторную клетку (такую как Т-клетка), содержащую мультивалентный CAR, который содержит полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый ВСМАсвязывающий фрагмент (такой как первое анти-ВСМА sdAb), специфически связывающийся с первым эпитопом ВСМА, и второй ВСМА-связывающий фрагмент (такой как второе анти-ВСМА sdAb), специфически связывающийся со вторым эпитопом ВСМА; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом первый эпитоп и второй эпитоп отличаются; а также (2) фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ ингибирования метастазирования в лимфатический узел. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ ингибирования метастазирования в легкое. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ ингибирования метастазирования в печень. Метастазирование может быть оценено с помощью любых известных методов в данной области техники, таких как анализы крови, сканирование костей, рентгеновское сканирование, КТ-сканирование, ПЭТ-сканирование и биопсия.

VII. Наборы и готовые изделия

В данном изобретении дополнительно предлагаются наборы, единичные дозы и готовые изделия, содержащие какие-либо однодоменные антитела, химерные антигенные рецепторы или сконструированные иммунные эффекторные клетки, описанные в данном

документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается набор, который содержит любую из описанных в данном документе фармацевтических композиций, и предпочтительно предлагаются инструкции для его применения.

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

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

коммерческой и потребительской точки зрения, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

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

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

VIII. Типовые варианты осуществления данного изобретения

Данное изобретение предусматривает следующие варианты осуществления:

Вариант осуществления 1. Однодоменное антитело (sdAb) анти-BCMA, содержащее любую из следующих областей: (1) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77; (2) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78; (3) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79; (4) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; (5) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81; (6) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; (7) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 30; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; (31) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; (32) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108; (33) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109; (34) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; (35) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111; (36) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112; (37) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113; или (38) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114.

Вариант осуществления 2. Анти-BCMA sdAb по варианту осуществления 1, отличающееся тем, что анти-BCMA sdAb содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115-152.

Вариант осуществления 3. Антитело анти-BCMA, которое конкурирует с антиBCMA sdAb по варианту осуществления 1 или 2.

Вариант осуществления 4. Антитело анти-BCMA по варианту осуществления 3, отличающееся тем, что антитело анти-BCMA представляет собой sdAb.

Вариант осуществления 5. Анти-BCMA sdAb по любому из вариантов осуществления 1, 2 и 4, отличающееся тем, что анти-BCMA sdAb представляет собой верблюжье антитело.

Вариант осуществления 6. Анти-BCMA sdAb по любому из вариантов осуществления 1, 2 и 4, отличающееся тем, что анти-BCMA sdAb представляет собой химерное антитело.

Вариант осуществления 7. Анти-BCMA sdAb по любому из вариантов осуществления 1, 2 и 4, отличающееся тем, что анти-BCMA sdAb является гуманизированным.

Вариант осуществления 8. Анти-BCMA sdAb по любому из вариантов осуществления 1-2 и 4-7, отличающееся тем, что анти-BCMA sdAb представляет собой фрагмент V_{HH} .

Вариант осуществления 9. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий полипептид, который содержит: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий анти-BCMA sdAb по любому из вариантов осуществления 1-2 и 4-7; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен.

Вариант осуществления 10. CAR по варианту осуществления 9, отличающееся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере два антиBCMA sdAb.

Вариант осуществления 11. Мультивалентный химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий полипептид, который содержит: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий по меньшей мере два BCMA-связывающих фрагмента; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен.

Вариант осуществления 12. Мультивалентный CAR по варианту осуществления 11, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит первый BCMA-связывающий фрагмент и второй BCMA-связывающий фрагмент.

Вариант осуществления 13. Мультивалентный CAR по варианту осуществления 12, отличающийся тем, что один или большее количество из первого BCMA-связывающего фрагмента и второго BCMA-связывающего фрагмента представляет собой sdAb.

Вариант осуществления 14. Мультивалентный CAR по варианту осуществления 12 или 13, отличающийся тем, что первый BCMA-связывающий фрагмент представляет собой первое анти-BCMA sdAb, а второй BCMA-связывающий фрагмент представляет собой второе анти-BCMA sdAb.

Вариант осуществления 15. Мультивалентный CAR по варианту осуществления 12 или 13, отличающийся тем, что первый ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой первое анти-ВСМА sdAb, а второй ВСМА-связывающий фрагмент является производным от антитела человека.

Вариант осуществления 16. Мультивалентный CAR по варианту осуществления 12 или 13, отличающийся тем, что первый ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой первое анти-ВСМА sdAb, а второй ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой полипептидный лиганд ВСМА.

Вариант осуществления 17. Мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 12-16, отличающийся тем, что первый ВСМА-связывающий фрагмент и второй ВСМА-связывающий фрагмент специфически связываются с одним и тем же эпитопом на ВСМА.

Вариант осуществления 18. Мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 12-16, отличающийся тем, что первый ВСМА-связывающий фрагмент и второй ВСМА-связывающий фрагмент специфически связываются с разными эпитопами на ВСМА.

Вариант осуществления 19. Мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 12-18, отличающийся тем, что первый ВСМА-связывающий фрагмент и/или второй ВСМА-связывающий фрагмент специфически связывается с эпитопом на ВСМА, производным от аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 388-394.

Вариант осуществления 20. Мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 12-19, отличающийся тем, что один или большее количество из первого ВСМА-связывающего фрагмента и второго ВСМА-связывающего фрагмента представляет собой анти-ВСМА sdAb по варианту осуществления 1.

Вариант осуществления 21. Мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 12-20, отличающийся тем, что первый ВСМА-связывающий фрагмент расположен на N-конце второго ВСМА-связывающего фрагмента.

Вариант осуществления 22. Мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 12-20, отличающийся тем, что первый ВСМА-связывающий фрагмент расположен на C-конце второго ВСМА-связывающего фрагмента.

Вариант осуществления 23. Мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 12-22, отличающийся тем, что первый ВСМА-связывающий фрагмент и

второй ВСМА-связывающий фрагмент являются слитыми друг с другом посредством пептидного линкера.

Вариант осуществления 24. Мультивалентный CAR по варианту осуществления 23, отличающийся тем, что пептидный линкер имеет длину не более чем около 50 аминокислот.

Вариант осуществления 25. Мультивалентный CAR по варианту осуществления 24, отличающийся тем, что пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 208-215.

Вариант осуществления 26. CAR или мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 9-25, отличающийся тем, что трансмембранный домен является производным от молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1.

Вариант осуществления 27. CAR или мультивалентный CAR по варианту осуществления 26, отличающийся тем, что трансмембранный домен является производным от CD8 α или CD28.

Вариант осуществления 28. CAR или мультивалентный CAR по варианту осуществления 27, отличающийся тем, что трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193 или 194.

Вариант осуществления 29. CAR или мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 9-28, отличающийся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки.

Вариант осуществления 30. CAR или мультивалентный CAR по варианту осуществления 29, отличающийся тем, что первичный внутриклеточный сигнальный домен является производным от CD3 ζ .

Вариант осуществления 31. CAR или мультивалентный CAR по варианту осуществления 30, отличающийся тем, что первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197 или 198.

Вариант осуществления 32. CAR или мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 9-31, отличающийся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен.

Вариант осуществления 33. CAR или мультивалентный CAR по варианту осуществления 32, отличающийся тем, что костимулирующий сигнальный домен является производным от костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27,

CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций.

Вариант осуществления 34. CAR или мультивалентный CAR по варианту осуществления 33, отличающийся тем, что костимулирующий сигнальный домен содержит цитоплазматический домен CD28 и/или цитоплазматический домен CD137.

Вариант осуществления 35. CAR или мультивалентный CAR по варианту осуществления 34, отличающийся тем, что костимулирующий сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195 и/или SEQ ID NO: 196.

Вариант осуществления 36. CAR или мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 32-35, отличающийся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит по меньшей мере два костимулирующих сигнальных домена.

Вариант осуществления 37. CAR или мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 9-36, дополнительно содержащий шарнирный домен, расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена.

Вариант осуществления 38. CAR или мультивалентный CAR по варианту осуществления 37, отличающийся тем, что шарнирный домен является производным от CD8 α .

Вариант осуществления 39. CAR или мультивалентный CAR по варианту осуществления 38, отличающийся тем, что шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 192.

Вариант осуществления 40. CAR или мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 9-39, дополнительно содержащий сигнальный пептид, расположенный на N-конце полипептида.

Вариант осуществления 41. CAR или мультивалентный CAR по варианту осуществления 40, отличающийся тем, что сигнальный домен является производным от CD8 α .

Вариант осуществления 42. CAR или мультивалентный CAR по варианту осуществления 41, отличающийся тем, что сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191.

Вариант осуществления 43. Химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 216-256 и 298-335.

Вариант осуществления 44. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR или мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 11-43.

Вариант осуществления 45. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 44, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 257-297 и 336-373.

Вариант осуществления 46. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 45, дополнительно содержащая последовательность второй нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CAR, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, функционально связана со последовательностью второй нуклеиновой кислоты посредством последовательности третьей нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид.

Вариант осуществления 47. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 46, при этом саморасщепляющийся пептид выбирают из группы, состоящей из T2A, P2A и F2A.

Вариант осуществления 48. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 47, при этом последовательность третьей нуклеиновой кислоты представляет собой SEQ ID NO: 385.

Вариант осуществления 49. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 44-48, при этом выделенная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК.

Вариант осуществления 50. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 44-49.

Вариант осуществления 51. Вектор по варианту осуществления 50, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой экспрессионный вектор.

Вариант осуществления 52. Вектор по варианту осуществления 50 или 51, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой вирусный вектор.

Вариант осуществления 53. Вектор по варианту осуществления 52, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

Вариант осуществления 54. Вектор по варианту осуществления 50 или 51, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой невирусный вектор.

Вариант осуществления 55. Сконструированная иммунная эффекторная клетка, содержащая CAR или мультивалентный CAR по любому из вариантов осуществления 943,

изолированная нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 44-49 или вектор по любому из вариантов осуществления 50-54.

Вариант осуществления 56. Сконструированная иммунная эффекторная клетка по варианту осуществления 55, отличающаяся тем, что указанная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку.

Вариант осуществления 57. Сконструированная иммунная эффекторная клетка по варианту осуществления 56, отличающаяся тем, что указанная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку.

Вариант осуществления 58. Фармацевтическая композиция, содержащая сконструированную иммунную эффекторную клетку по любому из вариантов осуществления 55-57, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 59. Способ лечения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции по варианту осуществления 58.

Вариант осуществления 60. Способ по варианту осуществления 59, отличающийся тем, что рак представляет собой множественную миелому.

Вариант осуществления 61. Способ по варианту осуществления 60, отличающийся тем, что рак представляет собой рефрактерную или рецидивирующую множественную миелому.

Вариант осуществления 62. Способ по любому из вариантов осуществления 59-61, отличающийся тем, что сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной.

Вариант осуществления 63. Способ по любому из вариантов осуществления 59-61, отличающийся тем, что сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной.

Вариант осуществления 64. Способ по любому из вариантов осуществления 59-63, отличающийся тем, что индивидуум представляет собой человека.

Вариант осуществления 65. Способ по любому из вариантов осуществления 59-64, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят внутривенно.

Вариант осуществления 66. Способ по любому из вариантов осуществления 59-65, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят в дозе от около 1×10^5 до около 1×10^7 клеток/кг.

Вариант осуществления 67. Способ по любому из вариантов осуществления 59-66, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят в 3 дробных дозах в течение около одной недели.

Вариант осуществления 68. Применение фармацевтической композиции по варианту осуществления 58 для лечения рака у индивидуума.

Вариант осуществления 69. Применение фармацевтической композиции по варианту осуществления 58 в приготовлении лекарственного средства для лечения рака у индивидуума.

Вариант осуществления 70. Фармацевтическая композиция, содержащая анти-BCMA sdAb по любому из вариантов осуществления 1-8.

Вариант осуществления 71. Способ лечения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции по варианту осуществления 70.

Вариант осуществления 72. Способ по варианту осуществления 71, отличающийся тем, что заболевание представляет собой рак.

ПРИМЕРЫ

Примеры, приведенные ниже, предназначены только для иллюстративных целей и поэтому не должны рассматриваться как ограничивающие данное изобретение какимлибо образом. Примеры не предназначены для представления того, что эксперименты, приведенные ниже, являются всеми или единственными экспериментами, которые проводились. Предприняты меры для обеспечения точности в отношении применяемых чисел (например, количеств, температуры и т. д.), но следует учитывать наличие некоторых экспериментальных погрешностей и отклонений. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Получение анти-BCMA sdAb

С целью разработки sdAb с высокой аффинностью связывания с BCMA, лам иммунизировали рекомбинантным антигеном BCMA. Для идентификации лидеров $V_{\text{H}}\text{H}$ создавали библиотеку фагового дисплея. Отдельные клоны произвольно собирали и классифицировали в соответствии с определяющей комплементарность областью 3 (CDR3) тяжелой цепи, которая может играть важную роль в связывании антигена. Протокол примера описан ниже. Другие протоколы получения sdAb описаны в литературе. См., например, Els Pardon et al, Nature Protocol, 2014; 9(3): 674.

1. Иммунизация животных и анализ иммунного ответа

1. 1 Иммунизация животных

Иммуноген, содержащий рекомбинантный антигенный белок ВСМА человека, имеющий С-концевой Fc-тег (ACRO Biosystems, № по каталогу: BC7-H5254), смешивали с адьювантом или ФСБ и вводили ламе. Животных иммунизировал представитель компании-поставщика (Cedarline) семь раз, как правило, применяя каждый раз 200 мкг иммуногена и СФА (полный адьювант Фрейнда) с интервалом от 1 недели до 2 недель. Образцы периферической крови собирали на этапе предварительной иммунизации и после 5-й и 7-й иммунизации. После нескольких циклов иммунизации у лам оценивали иммунные ответы на целевой антиген с целью определения титра антигенспецифических sdAb. Лимфоциты выделяли с помощью градиентного центрифугирования из около 100 мл периферической крови. Клетки дополняли RNALATER™ и хранили при минус 80 °С. Сыворотки получали с помощью центрифугирования образцов антикоагулированной крови и хранили при минус 80 °С.

1. 2 Фракционирование IgG

Фракционирование IgG на подклассы проводили согласно типовой рабочей инструкции GenScript. Подклассы IgG фракционировали из сыворотки терминальной крови с применением ионитов Protein G и Protein A. Образец 1 мл сыворотки помещали в колонку 1 мл HITRAP® Protein G HP и промывали колонку с помощью 10 мл фосфатного буфера (20 mM, pH 7,0). Фракцию IgG3 (MM 100 000 Да) элюировали с помощью 0,15 M NaCl, 0,58% уксусной кислотой (pH 3,5) и нейтрализовали элюат с помощью 1 M ТрисHCl (pH 9,0) до pH 7,4. Затем фракцию IgG1 (MM 170,000 Da) элюировали с помощью 0,1 M глицин-HCl (pH 2,7) и нейтрализовали элюат с помощью 1 M Трис-HCl (pH 8,5) до pH 7,4. Фильтрат колонки HITRAP® Protein G HP помещали в колонку 1 мл HITRAP® Protein A HP, и промывали колонку с помощью 20 мл фосфатного буфера (20 mM, pH 7,0). Фракцию IgG2 (MM 100 000 Да) элюировали с помощью 0,15 M NaCl, 0,58% уксусной кислотой (pH 4,5) и нейтрализовали элюат с помощью 1 M Трис-HCl (pH 9,0) до pH 7,4. Концентрации очищенных антител IgG1, IgG2 и IgG3 определяли с помощью OD280, а степень чистоты каждого из них оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях.

1. 3. Анализ иммунного ответа

Иммунный ответ у лам оценивали с помощью ELISA, в котором образцы сыворотки и очищенные IgG анализировали на предмет связывания с иммобилизованными иммуногенами. Оценивали образцы сывороток, собранные перед иммунизацией, после 5-й иммунизации и полученные из терминальной крови. Антиген (т.

е., рекомбинантный белок антигена человека) разбавляли в покрывающем буфере при концентрации 4 мкг/мл. Микротитровальный планшет покрывали разбавленным антигеном при 4 °С на ночь. Затем планшет промывали 3 раза промывочным буфером с последующим блокированием при комнатной температуре в течение 2 часов. После этого планшет промывали 4 раза промывочным буфером. Серии разбавленных сывороток или IgG добавляли на планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 1,5 часов. Затем планшет промывали 4 раза промывочным буфером. HRP-конъюгированное вторичное антитело против ламуса IgG добавляли на планшете инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывания в каждую лунку добавляли субстрат ТМБ и инкубировали в течение 10 минут перед остановкой с помощью 1 М HCl. Для количественного определения связывания, поглощение для каждой лунки измеряли при 450 нм с помощью спектрометра МКЗ.

2. Конструкция библиотеки фаговых дисплеев V_HH

2.1 Экстракция РНК

Общую РНК экстрагировали из изолированных лимфоцитов (из 1. 1. 1) с помощью реагента TRIZOL[®] согласно протоколу изготовителя. Количество и качество общей РНК оценивали с помощью гель-электрофореза и определяли количественно путем измерения поглощения при OD260/280.

2.2 от-ПЦР и амплификация V_HH

Общую РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с применением олиго(dT)₂₀ праймера с помощью набора для синтеза 1-й цепи кДНК PRIMESCRIPT[™] согласно протоколу производителя. Для усиления фрагментов V_HH разработаны шесть прямых и два обратных специфических вырожденных праймера, которые имели два участка рестрикции BglI. Фрагменты V_HH амплифицировали согласно типовой рабочей инструкции GenScript, как описано ниже.

Вариабельные области тяжелой цепи иммуноглобулина (т.е., V_HH) амплифицировали с помощью двухэтапной полимеразной цепной реакции (ПЦР). В первой ПЦР 100 нг матрицы кДНК смешивали с праймерами CALL001 (SEQ ID NO: 374) и CALL002 (SEQ ID NO: 375). Продукты ДНК из первой реакции ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. После выделения из геля продукты ДНК первой ПЦР применяли в качестве матриц во второй ПЦР. Вторую ПЦР выполняли с праймерами BACK-1 (SEQ ID NO: 376), BACK-2 (SEQ ID NO: 377) и PMCF (SEQ ID NO: 378). Амплифицированные продукты второй ПЦР, содержащие ПЦР-фрагменты V_HH выделяли из геля и расщепляли с помощью фермента, а затем вводили в плазмиды

фагмидов. Рекомбинантные плазмиды с фрагментами гена $V_{\text{H}}\text{H}$ с помощью электрической силы переносили в клетки *E. coli* для создания фагового дисплея иммунной библиотеки $V_{\text{H}}\text{H}$.

Процедура реакции ПЦР имеет начальный этап денатурации при 94 °С в течение 7 мин, с последующими 30 циклами при 94 °С в течение 1 мин, 55 °С в течение 1 мин, и 72°С в течение 1 мин; после этого конечный этап удлинения при 72 °С в течение 7 мин.

2. 3 Конструкция фаговой библиотеки

Продукты ПЦР $V_{\text{H}}\text{H}$ получали путем амплификации с применением различных пар праймеров. Затем продукты ПЦР расщепляли с помощью *Bgl*I и выделяли из геля. Выделенные из геля фрагменты вставляли в фагмидный вектор собственной разработки GenScript. Для оптимизации условий лигирования и трансформации сконструировали экспериментальную библиотеку. Для разработки библиотеки фагмидов применяли оптимизированные условия лигирования и трансформации. Небольшую часть трансформированных клеток разбавляли и просеивали на 2×YT планшетах, дополненных 100 мкг/мл ампициллина. С целью расчета размера библиотеки, колонии подсчитывали. Для оценки качества библиотеки случайным образом выбирали и секвенировали положительные клоны. Остальные трансформированные клетки просеивали на планшетах YT, дополненных 100 мкг/мл ампициллина и 2 % глюкозы. "Газоны" колоний соскабливали с планшетов. Для выделения плазмиды из библиотеки применяли небольшую аликвоту клеток. Остальные клетки дополняли глицерином и хранили при минус 80 °С в качестве запаса.

3. Пэннинг фагового дисплея

3. 1 Био-пэннинг

Сконструированную фаговую библиотеку $V_{\text{H}}\text{H}$ подвергали пэннингу на предмет рекомбинантного белка ВСМА человека и клеток СНО, экспрессирующих ВСМА человека (т.е., СНО-ВСМА, собственной разработки компании Legend Biotec) соответственно, пользуясь типовой рабочей инструкцией, разработанной компанией GenScript. Запас библиотеки выращивали до логарифмической фазы, после чего библиотеку освобождали с помощью фага-хелпера M13KO7 и амплифицировали в течение ночи при 25 °С в шейкере. Затем фаг осаждали с помощью PEG/NaCl, снова суспендировали в PBS и хранили при минус 80 °С. Для твердофазного пэннинга лунки микропланшета покрывали рекомбинантным белком ВСМА человека в ФСБ при 4 °С на ночь. Для жидкофазного пэннинга клетки СНО-ВСМА блокировали с помощью блокирующего буфера при комнатной температуре в течение 1 часа. На этапе покрытия

или блокирования фаговые частицы предварительно инкубировали с блокирующим буфером и контрольным белком Fc в лунках микропланшета. После предварительной инкубации фаговые частицы добавляли в лунки, покрытые белками ВСМА или раствором СНО-ВСМА, и инкубировали в течение 1 часа. После инкубации несвязанные и неспецифически связанные фаги вымывали путем шестиразового промывания лунок или клеток СНО-ВСМА с помощью PBST с двумя дополнительными промываниями с помощью ФСБ. Связанные фаговые частицы элюировали с помощью 100 мМ триэтиламина (ТЭА), а элюат нейтрализовали с помощью 1 М Трис-НСl (рН 7,4). Половину элюата затем применяли для инфицирования экспоненциально растущих TG1 клеток *E. coli* (OD₆₀₀ равно 0,4~0,6) для выходного титрования.

3. 2 ИФА для фага

ИФА для фага проводили с целью идентификации клонов, специфичных для антигенов-мишеней. Отдельные клоны полученного фага выращивали в 96-луночном планшете и освобождали с помощью фага-хелпера M13KO7 в течение ночи. Для идентификации клонов, которые связываются с белками антигена, 96-луночные микротитровальные планшеты для ELISA покрывали рекомбинантным белком ВСМА человека и контрольным белком Fc соответственно в покрывающем буфере на ночь при 4°C, после чего планшеты блокировали с помощью блокирующего буфера. После блокирования, на планшеты добавляли около 50 мкл на лунку фагового супернатанта из культуры клеток, выращенной в течение ночи, для 1,5-часовой инкубации при 4 °С. Планшеты промывали четыре раза и добавляли на планшеты конъюгированное с HRP моноклональное антитело анти-M13 для 45-минутной инкубации при 4 °С. Планшеты снова промывали пять раз, и в лунки добавляли раствор субстрата для созревания. Для каждой лунки измеряли абсорбцию при 450 нм.

Для идентификации клонов, которые связывают клетки СНО-ВСМА, клетки СНОВСМА блокировали с помощью блокирующего буфера при комнатной температуре в течение 1 часа. После блокирования, к растворам клеток добавляли около 20 мкл на лунку фагового супернатанта из культуры клеток, выращенной в течение ночи, для 1-часовой инкубации при комнатной температуре. После четырехразового промывания клеток конъюгированное с HRP моноклональное антитело анти-M13 добавляли для 30-минутной инкубации при комнатной температуре. Клетки промывали пять раз, и после этого добавляли раствор субстрата для созревания. Абсорбцию измеряли при 450 нм. После пэннинга, идентифицировали ИФА-положительные клоны фага, и из полученного фага

готовили ДНК с помощью наборов для экстракции плазмид. Анти-BCMA $V_{\text{H}}\text{H}$ в плаزمидах секвенировали.

Пример 2. Получение типовых одновалентных химерных антигенных рецепторов BCMA

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая каркасный полипептид CAR, содержащий от N-конца до C-конца: шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD28, цитоплазматический домен CD28, цитоплазматический домен CD137 и цитоплазматический домен CD3 ζ , была химически синтезирована и клонирована в предварительно модифицированный лентивирусный вектор, расположенный по ходу транскрипции, и функционально связанный с конститутивным hEF1 α -промотором. Полученный каркасный вектор CAR был назван "PLLV-hEF1 α -8281373". Множественные сайты клонирования (MCS) в векторе позволили вставить последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность Козак (SEQ ID NO: 379), функционально связанной с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальный пептид CD8 α , слитый с N-концом фрагмента $V_{\text{H}}\text{H}$, в вектор PLLV-hEF1 α 8281373, расположенный против хода транскрипции и функционально связанный с каркасной последовательностью CAR.

Для построения моноспецифического CAR, имеющего одиночный домен $V_{\text{H}}\text{H}$, используя каркас PLLV-hEF1 α -8281373, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую домен $V_{\text{H}}\text{H}$ функционально связывали с 3'-нуклеотидной последовательностью, кодирующей сигнальный пептид CD8 α . Последовательность слитой нуклеиновой кислоты химически синтезировали и клонировали в каркас PLLVhEF1 α -8281373 CAR посредством участков рестрикции EcoRI (SEQ ID NO: 380: 5'GAATTC-3') и SpeI (SEQ ID NO: 381: 5'-ACTAGT-3') с помощью молекулярных методов клонирования, известных в данной области техники. В таблице 4 перечислены векторы, которые были сконструированы для экспрессии типовых моноспецифических, одновалентных анти-BCMA CAR.

Для удобства дальнейшего встраивания дополнительных последовательностей, таких как нуклеотид, кодирующий второй $V_{\text{H}}\text{H}$, при проектировании конструкции моноспецифического CAR, участки рестрикции, включая HpaI (SEQ ID NO: 382: 5'GTTAAC-3'), MluI (SEQ ID NO: 383: 5'-ACGCGT-3'), NsiI (SEQ ID NO: 384: 5'-ATGCAT3') участки были включены между последовательностью нуклеиновой кислоты сигнального пептида CD8 α и последовательностью нуклеиновой кислоты $V_{\text{H}}\text{H}$.

Упакованную смесь плазмид лентивируса, включающую рCMV-ΔR-8,74 и рMD2. G (Addgene # 12259), предварительно смешивали с векторами PLLV-hEF1α-8281373, имеющими фрагменты V_{НН} в предварительно оптимизированном соотношении с полиэфиримидом (PEI), затем надлежащим образом перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Затем трансфекционную смесь добавляли по каплям к клеткам НЕК293 и осторожно перемешивали. Затем клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе для клеток при 37 °С и 5% CO₂. Супернатанты собирали после центрифугирования при 4 °С, 500 г в течение 10 мин.

Вирусосодержащие супернатанты фильтровали через 0,45 мкм PES-фильтр с последующим ультрацентрифугированием для концентрирования лентивирусов. После ультрацентрифугирования супернатанты осторожно отделяли, а вирусные гранулы аккуратно ополаскивали предварительно охлажденным ФСБД. Вирус надлежащим образом аликвотировали, а затем сразу же замораживали для хранения при минус 80 °С. Титр вируса определяли на основании р24 с помощью набора HTRF, разработанного компанией GenScript.

Получение МКПК

Лейкоциты собирали из здоровых доноров путем афереза, и доводили концентрацию клеток до 5×10^6 клеток /мл в среде R10. Затем лейкоциты смешивали с 0,9% раствором NaCl при соотношении 1:1 (об./об.). В 15 мл центрифужную пробирку добавляли 3 мл среды Lymphoprep и медленно добавляли 6 мл разбавленной смеси лимфоцитов на поверхность среды Lymphoprep. Смесь лимфоцитов центрифугировали при 800 г в течение 30 минут без перерывов при 20 °С. Затем лимфоцитарную пленку собирали с помощью пипетки 200 мкл. Собранную фракцию разбавляли по меньшей мере в 6 раз 0,9% NaCl или R10 для уменьшения плотности раствора. Собранную фракцию затем центрифугировали при 250 г в течение 10 минут при 20 °С. Супернатант полностью аспирировали и к осадку клеток добавляли 10 мл R10 для ресуспендирования клеточного осадка. Смесь затем центрифугировали при 250 г в течение 10 минут при 20 °С. Супернатант снова аспирировали. В осадок клеток добавляли 2 мл предварительно нагретого до 37 °С R10 с 100 МЕ/мл IL-2, и осадок клеток осторожно ресуспендировали. Число клеток определяли после окрашивания трипановым синим, и этот образец МКПК был готов для последующих экспериментов.

Очистка Т-клеток

Т-клетки человека очищали от МКПК с помощью набора для выделения Т-клеток Miltenyi Pan (Miltenyi Pan T cell isolation kit) (Cat # 130-096-535) согласно протоколу

производителя, как описано ниже. В первую очередь определяли число клеток и суспензию клеток центрифугировали при 300 г в течение 10 минут. Затем супернатант аспирировали полностью, а клеточные гранулы повторно суспендировали в 40 мкл буфера на 10^7 общего количества клеток. 10 мкл смеси Т-клеточного биотина и антитела Pan (Pan T Cell Biotin-Antibody Cocktail) добавляли на 10^7 общего количества клеток, тщательно перемешивали и инкубировали в течение около 5 минут в холодильном аппарате (2~8 °С). Затем добавляли 30 мкл буфера на 10^7 общего количества клеток. 20 мкл смеси Тклеточных микрогранул Pan (Pan T Cell MicroBead Cocktail) добавляли на 10^7 клеток. Смесь суспензии клеток хорошо перемешивали и инкубировали в течение еще 10 минут в холодильном аппарате (2-8 °С). Для разделения в магнитном поле требуется минимум 500 мкл. Для разделения в магнитном поле колонку LS помещали в магнитное поле подходящего сепаратора MACS. Колонку подготавливали путем промывания 3 мл буфера. Суспензию клеток затем наносили на колонку и собирали фильтрат, содержащий немеченые клетки, которые представляли собой фракции обогащенных Т-клеток. Дополнительные Т-клетки получали путем промывания колонки 3 мл буфера и сбора немеченых клеток, которые попадали в фильтрат. Как и в предыдущем случае, эти немеченые клетки представляли собой обогащенные Т-клетки и были объединены с фильтратом, полученным на предыдущем этапе. Объединенные обогащенные Т-клетки затем центрифугировали и повторно суспендировали в R10 плюс 100 МЕ/мл IL-2.

Подготовленные Т-клетки затем предварительно активировали в течение 48-96 часов с помощью набора для активации/размножения Т-клеток человека (Miltenyi # 130091-441) согласно протоколу изготовителя, в котором частицы MACSiBead антиCD3/CD28 добавляли в соотношении "гранула-клетка" 1:2.

Анализ цитотоксичности *in vitro*

Предварительно активированные Т-клетки трансдуцировали лентивирусным материалом в присутствии 7 мкг/мл полибрена путем центрифугирования при 1200 г, 32°С в течение 1,5 ч. Трансдуцированные клетки затем переносили в инкубатор для клеточной культуры с целью экспрессии трансгена в пригодных условиях.

На день 3 или день 7 после трансдукции трансдуцированные Т-клетки собирали и совместно инкубировали с опухолевыми клетками в течение 20 часов при соотношении эффекторных клеток (CAR-T) и клеток-мишеней 20:1. Клетками-мишенями были либо линия клеток множественной миеломы человека RPMI8226.Luc, линия клеток человека K562. BCMA.Luc, которая рекомбинантно экспрессировала BCMA, K562. CD19.Luc, которая рекомбинантно экспрессировала CD19, либо линия клеток глиобластомы человека

U87MG.Luc. Все линии клеток были сконструированы на собственной базе для экспрессии люциферазы светлячков. Для анализа цитотоксичности CAR-T, направленной на опухолевые клетки, реагенты для анализа люминесценции люциферазы ONE-GLO™ (Promega # E6110) готовили согласно протоколу производителя и добавляли к совместно культивируемым клеткам для обнаружения остаточной активности люциферазы в лунке. Поскольку люцифераза экспрессируется только в клетках-мишенях, то остаточная активность люциферазы в лунке напрямую коррелирует с количеством жизнеспособных клеток-мишеней в лунке. Максимальную активность люциферазы получали путем добавления культуральной среды к клеткам-мишеням в отсутствие эффекторных клеток. Минимальную активность люциферазы определяли добавлением Triton X-100 при конечной концентрации 1% в тот момент, когда начинали исследования цитотоксичности. Специфическую цитотоксичность рассчитывали по формуле: Специфическая цитотоксичность % = $100\% * (1 - (RLU \text{ образца} - RLU_{\text{min}}) / (RLU_{\text{max}} - RLU_{\text{min}}))$.

Типовой одновалентный CAR, нацеленный на BCMA (CD269), выбирали и тестировали в анализе цитотоксичности. Как проиллюстрировано на Фиг. 1А, среди первой группы протестированных одновалентных BCMA CAR, отобранные клоны проявляли различные уровни цитотоксичности, направленной на линии клеток множественной миеломы RPMI8226.Luc. с более чем 60 % одновалентных CAR-T на основе V_HH, демонстрирующих более 50 % цитотоксичности, направленной на клетки RPMI8226.Luc. Клоны CAR-T на основе 269A37346, 269A37348, 269A37353 и 269A37355 отбирали для дальнейшего исследования. В частности, клоны CAR-T на основе 269A37346, 269A37348, 269A37353 и 269A37355 проявляли сильную цитотоксичность, направленную на линию клеток множественной миеломы RPMI8226.Luc с более чем 2030 % повышением уровня гибели клеток RPMI8226.Luc, обусловленной CAR -Т, по сравнению с нетрансдуцированными контрольными Т-клетками (UnT). Тем не менее, такое повышение цитотоксичности, направленной на линии клеток глиобластомы человека U87MG.Luc, не наблюдали (см. ФИГ. 1В). Не обнаружено никаких достоверных эффектов цитотоксичности, проявляемых одновалентными CAR-T-клетками на основе V_HH и направленными на клетки U87MG.Luc, по сравнению с контрольными UnT. Наблюдения, описанные выше, продемонстрировали, что некоторые из этих клонов могут быть целенаправленными и имеющими влияние на BCMA-положительные клетки.

Вторую группу типовых одновалентных BCMA CAR оценивали относительно цитотоксичности *in vitro*. GSS005, CAR, содержащий анти-BCMA scFv, применяли в качестве положительного контроля. GSI026, CAR, содержащий анти-EGFRvIII scFv,

применяли в качестве отрицательного контроля. Как проиллюстрировано на ФИГ. 2А-2В, отобранные клоны проявляли различные уровни цитотоксичности, направленной на линии клеток множественной миеломы RPMI8226.Luc, и ВСМА, сверхэкспрессирующий стабильную линию клеток K562. ВСМА.Luc. Никакие клоны не проявляли сильной цитотоксичности, направленной на ВСМА-отрицательную линию клеток K562. CD19.Luc (Фиг. 2С). Среди этих клонов, CAR-T на основе 269В005S, 269В028S, 269В030S, 269В054S, 269В060S, 269В069S, 269В093S, 269В094S, 269В104S, 269В109S, 269В110S и 269В129S были наиболее сильными в соответствии с данными цитотоксичности.

Высвобождение IFN-гамма

Кроме того, супернатанты из анализов совместного культивирования *in vitro* собирали для оценки высвобождения цитокинов, индуцированного CAR, например, высвобождения интерферона гамма (т.е. IFN γ). Как проиллюстрировано на Фиг. 3, Тклетки, экспрессирующие отобранные одновалентные ВСМА CAR, высвобождали высокие уровни IFN γ при совместном культивировании с ВСМА-экспрессирующими клетками-мишенями K562. ВСМА.Luc. Неспецифические CAR-T, такие как GSI026, или нетрансдуцированные Т-клетки (UnT), не индуцировали высвобождение IFN γ в совместной культуре. Данные о высвобождении цитокинов согласуются с данными цитотоксичности *in vitro*.

Пример 3. Получение типовых мультивалентных химерных антигенных рецепторов ВСМА

Мультивалентные CAR на основе V_HH можно сконструировать путем клонирования последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей множество копий V_HH, или множество разных V_HH, слитых с каждым другим посредством пептидных линкеров, в каркасный вектор сигнального домена CAR. Типовые мультивалентные конструкции ВСМА CAR приведены в Таблице 5. Эти конструкции получали путем слияния 2-3 анти-ВСМА V_HH с помощью глицин-серинового пептидного линкера с последующим непосредственным синтезированием этой слитой последовательности в комбинации с последовательностью нуклеиновой кислоты сигнального пептида KozakCD8 α , и клонированием в каркас PLLV-hEF1 α -81373 CAR посредством участков рестрикции EcoRI и SpeI. Моновалентные конструкции ВСМА CAR также клонировали в один и тот же каркас PLLV-hEF1 α -81373 CAR в качестве контролей (например, GSI5011, GSI5019 и GSI5020, Таблица 4).

Лентивирусные векторы, несущие гены CAR, упаковывали и титровали согласно протоколам, как описано в Примере 2. Применяя протоколы, описанные в Примере 2,

МКПК человека получали из периферической крови добровольцев для дальнейшего выделения первичных Т-клеток человека с помощью наборов для выделения Т-клеток человека Miltenyi Pan (Miltenyi human PanT cell isolation kit). Очищенные Т-клетки предварительно активировали и размножали с применением микрогранул анти-CD3/CD28 Miltenyi, как описано в Примере 2. После этого предварительно активированные Т-клетки трансдуцировали лентивирусным материалом в присутствии 7 мкг/мл полибрена путем центрифугирования при 1200 г, 32 °С в течение 1,5 ч. Трансдуцированные клетки затем переносили в инкубатор для клеточной культуры с целью экспрессии трансгена в пригодных условиях.

Анализ цитотоксичности *in vitro*

На день 3 после трансдукции трансдуцированные Т-клетки собирали и совместно инкубировали с опухолевыми клетками. Для анализа цитотоксичности CAR-T, направленной на опухолевые клетки, реагенты для анализа люминесценции люциферазы ONE-GLO™ добавляли к совместно культивируемым клеткам и измеряли специфическую цитотоксичность для каждого CAR-T, как описано в Примере 2.

В первом эксперименте одновалентные BCMA CAR (GSI5011), двухвалентные BCMA CAR (GSI5014) и трехвалентные BCMA CAR (GSI5015), экспрессирующие Т-клетки, совместно инкубировали в течение 20 часов с клетками RPMI8226.Luc при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 20:1. Все три конструкции CAR содержат домены BCMA VHH клона 269A37346. Как проиллюстрировано на Фиг. 4А, удельный процент лизиса клеток RPMI8226.Luc составлял 63,25 плюс/минус 2,64 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5011, 61,04 плюс/минус 2,75 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5014, и 59,57 плюс/минус 2,64 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5015, по сравнению с неспецифическим лизисом (0,05 % плюс/минус 2,33 %), обусловленным нетрансдуцированными контрольными Т-клетками (UnT). Проанализированные BCMA CAR с различными антигенсвязывающими модальностями обладают сильной противоопухолевой активностью, направленной на BCMA-положительные клетки.

Во втором эксперименте анализировали типовые двухвалентные BCMA CAR (GSI5021-GSI5026), имеющие два различных BCMA-связывающих фрагмента: 269A37353 и 269A37917. Сконструированные Т-клетки, экспрессирующие каждый двухвалентный BCMA CAR, совместно инкубировали в течение 20 часов с клетками RPMI8226.Luc при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 20:1. Моновалентные BCMA CAR, GSI5019 и GSI5020, также анализировали для сравнения. Как проиллюстрировано на Фиг.

4В, удельный процент лизиса клеток RPMI8226.Luc составлял 88,21 плюс/минус 1,29 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5019, 93,84 плюс/минус 1,13 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5020, 71,45 плюс/минус 1,79 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5021, 99,80 плюс/минус 0,45 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5022, 97,46 плюс/минус 0,50 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5023, 81,29 плюс/минус 1,27 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5024, 93,50 плюс/минус 0,47 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5025, 87,83 плюс/минус 0,23 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5026, соответственно, по сравнению с нетрансдуцированными контрольными Т-клетками - 13,49% плюс/минус 1,75 % (UnT). Как проиллюстрировано на Фиг. 4С, удельный процент лизиса ВСМА-отрицательной линии клеток U87MG.Luc составил 2,84 плюс/минус 7,41 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5019, 15,50 плюс/минус 2,24 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5020, 6,74 плюс/минус 3,37 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5021, 8,03 плюс/минус 2,36 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5022, 9,00 плюс/минус 1,88 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5023, 17,03 плюс/минус 2,27 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5024, 16,81 плюс/минус 1,98 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5025, -11,55 плюс/минус 5,43 % для CAR-T-клеток, экспрессирующих GSI5026, по сравнению с нетрансдуцированными контрольными Т-клетками - 12,49% плюс/минус 3,79 % (UnT). Приведенные данные свидетельствуют о том, что двухвалентные CAR с различными антигенсвязывающими модальностями обладают сильной противоопухолевой активностью, направленной на ВСМА-положительные клетки, но не на ВСМА-отрицательные клетки.

В третьем эксперименте конструировали типовые двухвалентные ВСМА CAR (то есть BCAR001-BCAR008), имеющие два различные ВСМА-связывающие фрагменты, а сконструированные CAR-T-клетки, экспрессирующие двухвалентные ВСМА CAR, готовили из первичных Т-клеток, полученных от пациента-донора R/R MM #13. В качестве клеток-мишеней применяли линии клеток люциферазы светлячков собственной разработки, в том числе RPMI8226 (линия клеток множественной миеломы человека), A549 (линия клеток рака легких человека), U87-MG (линия клеток глиобластомы человека) и Raji (линия клеток лимфомы Беркитта человека) и совместно культивировали с каждой группой трансдуцированных Т-клеток одновременно (при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 20:1 или 5:1) в течение 20 часов в инкубаторе для клеток при 37 °C/5% CO₂. После завершения совместного культивирования остаточную активность люциферазы (относительная световая единица, RLU) анализировали с помощью набора

для анализа люминесценции люциферазы ONE-GLO™ (Promega) с целью оценки цитотоксичности каждого CAR-T. Как проиллюстрировано на ФИГ. 5А-5Е, двухвалентные ВСМА CAR-T обладали дозозависимой цитотоксичностью по отношению к клеткам RPMI8226.Luc, K562. ВСМА.Luc и Raji.Luc, а также незначительную цитотоксичность по отношению к ВСМА-отрицательным клеткам A549.Luc и U87MG.Luc. Данные на Фиг. 5F демонстрируют, что цитотоксичность двухвалентных ВСМА CAR-T-клеток, направленная против опухолевых клеток, является ВСМА-специфичной, поскольку CAR-T-клетки не являются цитотоксичными по отношению к клеткам K562. С38.Luc, которые были CD38⁺/ВСМА⁻. Клетки K562. ВСМА.Luc, обработанные только ВСAR001-ВСAR008 CAR-T-клетками, продемонстрировали ограниченную остаточную активность люциферазы (т. е. жизнеспособные клетки) по сравнению с клетками-мишенями, обработанными UnT (2,88 плюс/минус 0,45 %, 12,84 плюс/минус 1,67 %, 2,22 плюс/минус 0,56 %, 1,77 плюс/минус 0,14 %, 2,59 плюс/минус 0,28 %, 6,58 плюс/минус 1,19 %, 2,47 плюс/минус 0,20 %, 6,61 плюс/минус 1,47 % для ВСAR001-ВСAR008 соответственно, по сравнению с UnT 100 плюс/минус 3,95 %, среднее плюс/минус стандартная ошибка). Эти результаты демонстрируют сильную цитотоксичность двухвалентных клеток ВСМА CAR-T-клеток, направленную против клеток K562. ВСМА.Luc. ВСAR001-ВСAR008 CAR-T-клетки не обладали значительной цитотоксичностью против клеток K562.CD38.Luc, поскольку никакого значительного снижения активности люциферазы не было обнаружено по сравнению с клетками-мишенями, обработанными UnT (111,82 плюс/минус 5,11 %, 111,72 плюс/минус 3,43 %, 104,74 плюс/минус 0,24 %, 95. 04 плюс/минус 2.70 %, 93. 93 плюс/минус 7. 23 %, 97. 72 плюс/минус 1,86 %, 111,90 плюс/минус 2,01 %, 108. 33 плюс/минус 4,05 %, для ВСAR001-ВСAR008 соответственно, по сравнению с UnT 100 плюс/минус 6,58 %, среднее плюс/минус стандартная ошибка). Эти данные свидетельствуют о том, что цитотоксичность двухвалентного ВСМА CAR-T является ВСМА-зависимой.

Высвобождение IFN-гамма

Кроме того, супернатанты из анализов совместного культивирования *in vitro* собирали для оценки высвобождения цитокинов, индуцированного CAR (например, интерферона гамма, высвобождения IFN γ). Как проиллюстрировано на ФИГ. 6А-6В, высвобождение IFN γ в анализах с совместной культурой было CAR-зависимым и ВСМА-специфичным, что согласуется с данными цитотоксичности *in vitro* (Таблица 6).

Таблица 6. Высвобождение IFN-гамма в анализах совместной культуры посредством двухвалентного ВСМА CAR-T

	RPMI8226.Luc		A549.Luc		K562.CD38.Lu		Raji.Luc	
	Среднее, пг/мл	СО	Средне е, пг/мл	СО	Средне е, пг/мл	СО	Среднее , пг/мл	СО
BCAR001	1097,23	61,87	89,18	42,19	135,81	5,87	795,87	7,29
BCAR002	4651,22	1,13	503,63	130,73	361,87	49,68	3613,30	34,04
BCAR003	3569,84	108,19	243,82	1,31	265,08	3,24	3348,66	49,80
BCAR004	3077,41	110,82	161,70	12,97	128,50	17,08	2931,11	120,31
BCAR005	2850,34	20,16	170,90	8,27	141,20	17,54	2976,27	67,22
BCAR006	2023,71	37,61	223,96	6,21	215,00	17,87	1588,54	77,96
BCAR007	1912,98	2,28	239,43	1,93	289,72	1,94	1472,87	49,76
BCAR008	1798,90	76,85	258,71	19,39	171,89	6,51	1526,93	66,70
UnT	281,75	20,55	143,70	10,46	85,65	1,98	328,61	6,69

Число копий интегрированных генов CAR

Число копий интегрированных генов CAR для каждой группы трансдуцированных Т-клеток определяли с помощью полуколичественного метода ПЦР (колПЦР). Вкратце, геномную ДНК из каждой группы CAR-T получали с помощью набора Gentra Puregene Cell Kit (Qiagen). Концентрацию геномной ДНК определяли с помощью Nanodrop, а образец 10 г геномной ДНК для стандартизированного анализа методом колПЦР обрабатывали SYBR Green Realtime PCR Master mix plus (Toyobo) на устройстве q-PCR ABI # 7300 с применением специфических праймеров CAR (прямой праймер 137P2F (SEQ ID NO: 398: 5'-GTCSTTCTCCTGTCACTGGTTAT-3'; и обратный праймер 137P2R, SEQ ID NO: 399: 5'-TCTTCTTCTTCTGGAAATCGGCA-3'). Относительное количество копий каждого интегрированного гена CAR вычисляли на основании стандартной кривой, полученной с помощью плазмиды, содержащей целевые последовательности.

Как видно из Таблицы 7, высокое число копий вектора CAR было интегрировано в геном Т-клеток в каждом препарате CAR-T.

Таблица 7. Количество копий интегрированного генома

CAR конструкциями	Т-клетки	с	Копии/уи гДНК
GSI5019			35091,6
GSI5020			27627,2
GSI5021			24926,8
GSI5022			26393,6
GSI5023			32376,3
GSI5024			39319,8
GSI5025			22269,3
GSI5026			34790,4
UnT			26,6

Пример 4. Картирование эпитопов и дифференциальное связывание эпитопов двух доменов V_{H1} в LCAR-B38M

Картировали эпитопы четырех доменов анти-BCMA V_{H1} . Сконструировали типовой двухвалентный BCMA CAR, имеющий два разных домена анти-BCMA V_{H1} , которые специфически связываются с различными эпитопами BCMA.

Двухвалентный/двухэпитопный CAR, содержащий V_{H1} и V_{H2} , называемый LCARB38M CAR, представляет собой один мультивалентный BCMA CAR, указанный в Таблице 5.

Анализ поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

Каждую из четырех типовых последовательностей анти-BCMA V_{H1} клонировали в вектор, содержащий последовательность Fc-фрагмента IgG1 человека (hIgG1Fc), чтобы облегчить рекомбинантную экспрессию BCMA V_{H1} -hIgG1Fc. Рекомбинантные белки получали и очищали для анализов ППР.

Аффинность каждого V_{H1} -hIgG1Fc для BCMA определяли с помощью ППР с применением аналитической системы BIACORE[®] 2000 (GE Healthcare). Вкратце, каждый протеин V_{H1} -hIgG1Fc ковалентно связывался с сенсорным чипом CM5(s) с применением 4 мкг/мл V_{H1} -hIgG1Fc. Рекомбинантный белок BCMA-His (ACRO Biosystems, Cat # BCAN522у) серийно разводили в подвижном буфере (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТК, 0,05% Твин-20, pH 7,4) и вводили при расходе 10 мкл/мин с последующей

диссоциацией. Константы скорости ассоциации и диссоциации определяли с применением оценочного программного обеспечения BIACORE® 2000 версии 3. 0 (связывание Ленгмюра, локальная подгонка, модель связывания 1:1). Аффинности связывания четырех V_HH-hIgG1Fc приведены в Таблице 8.

Таблица 8. Аффинности связывания V_HH-hIgG1Fc с белком ВСМА-His человека.

Лиганд	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	K _D (М)
V _H H1-hIgG1Fc	5,5E+04	менее 1,0E-05*	менее 1,8E-10*
V _H H2-hIgG1Fc	1,9E+06	1,5E-02	7,8E-09
V _H H3-hIgG1Fc	3,4E+04	1,7E-04	5,1E-09
V _H H4-hIgG1Fc	2,1E+06	9,4E+04	4,6E-10

Связывание рекомбинантных белков V_HH-His с клетками-мишенями

Рекомбинантные белки анти-ВСМА V_HH-His конструировали путем слияния последовательности анти-ВСМА V_HH с сигнальной пептидной последовательностью альбумина человека (N³-МКWVTFISLLFLFSSAYS-C³; SEQ ID NO: 386) на N-конце и 6xHis-тега (N¹-GSGHNNNNH-C¹; SEQ ID NO: 387) на C-конце. Кодоны дополнительно оптимизировали для оптимальной экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих. Полученные нуклеотидные последовательности затем клонировали в экспрессионный вектор млекопитающего рТТ5 через участки рестрикции 5'-XbaI и 3'-HindIII с получением плазмид рТТ5-LAB001 (для V_HH1), рТТ5-LAB002 (для V_HH2) и рТТ5-LAB003 (для V_HH1xV_HH2).

Для получения рекомбинантных белков ВСМА V_HH клетки НЕК293Т временно трансфицировали указанными плазмидами. Вкратце, клетки НЕК293Т в количестве 5×10⁶ высевали в 10 см чашки для культур клеток за день до трансфекции. На следующий день клетки трансфицировали каждой плазмидой с применением реагента LIPOFECTAMINE™ 2000 Reagent (Thermofisher Scientific, номер по каталогу: 11668-019) в соответствии с инструкциями производителя. Через четыре дня после трансфекции супернатант собирали и уровни экспрессии антител определяли с помощью ИФА с применением HRP анти-His тега (Biolegend, номер по каталогу: 652504). Уровни экспрессии LAB001, LAB002 и LAB003 составили 109,31 нг/мл, 152,48 нг/мл и 396,62 нг/мл соответственно.

Аффинности связывания белков LAB001, LAB002 и LAB003 анти-ВСМА V_HH-His определяли с помощью клеточных анализов. Вкратце, серийно разведенные белки анти-ВСМА V_HH-His инкубировали с клетками-мишенями в количестве 1×10⁵ (клетки

K562. BCMA.Luc или K562.CD38.Luc, которые были линиями клеток собственной разработки, стабильно экспрессирующими BCMA или CD39 соответственно) при 4°C в течение 2 часов. Затем клетки центрифугировали при 300 г в течение 10 мин и супернатант сливали. Клеточный осадок повторно суспендировали в ФСБД. Клеточный осадок промывали, центрифугировали и супернатант сливали еще 2 раза. Затем клеточный осадок повторно суспендировали в течение 45 мин с детектирующим антителом (THE™ His тег антитело [FITC], номер по каталогу GenScript: A01620), содержащим буферы при 4°C в течение 2 часов. Затем клетки центрифугировали при 300 г в течение 10 мин и супернатант сливали. Клеточный осадок промывали, центрифугировали и супернатант сливали еще 2 раза. Аффинности связывания LAB001, LAB002 и LAB003 с клетками K562. BCMA.Luc или K562.CD38.Luc определяли с помощью проточного цитометра ATTUNE™ Nxt. Данные аппроксимировали с помощью GraphPad PRISM™ версии 6. 0, используя «специфическое для одного сайта связывание с угловым коэффициентом Хилла».

Как проиллюстрировано на Фиг. 7А-7С, LAB001, LAB002 и LAB003 специфически связываются с клетками K562. BCMA.Luc дозозависимым образом. Аффинности связывания составляют 0,079 нМ, 0,035 нМ и 0,0047 нМ соответственно. Ни одно из антител не проявляло значительного связывания с BCMA-негативной линией клеток K562.CD38.Luc. Более того, LAB003 ($V_{H1} \times V_{H2}$) продемонстрировал значительно более высокую аффинность связывания (0,0047 нМ), чем LAB001 (V_{H1}) или LAB002 (V_{H2}).

Связывание эпитопа

BCMA (NP_001183, UniProt # Q02223) представляет собой трансмембранный белок длиной 184 аминокислот. BCMA человека состоит из внеклеточного домена (ECD, аминокислотный остаток номер 1-54), трансмембранного домена (TM, аминокислотный остаток номер 55-77) и цитоплазматического домена (CD, аминокислотный остаток номер 78-184). Кроме того, анализ последовательности предполагает, что BCMA не имеет распознаваемого сигнального пептида на своем N-конце (Laabi Y et al. (1992) EMBO J 11: 3897–3904; Laabi Y et al. (1994) Nucleic Acids Res 22: 1147–1154; Gras M P (1995) Int Immunol 7: 1093–1106; Hong-Bing Shu and Holly Johnson (2000): Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 10. 1073).

Как также проиллюстрировано в онлайн-базе данных UniProt (всеобщий доступ: web. uniprot. org/uniprot/Q02223), 3 дисульфидных связи (Cys-Cys) расположены в ECD BCMA, которые находятся в положениях 8 ↔ 21, 24 ↔ 37 и 28 ↔ 41 (Таблица 9). Вторичная структура BCMA ECD от N-конца до C-конца состоит из бета-цепи (aa12-15),

поворота (aa16-19), бета-цепи (aa20-23), спирали (aa 24 -27), бета-цепи (aa30-32), спирали (aa35-37), поворота (aa38-40) и поворота (aa42-44). На Фиг. 8А изображена структура ВСМА ECD, который реплицирован из структуры из базы данных PDB со всеобщим доступом: web.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2kn1/.

Таблица 9. Белковые последовательности ВСМА человека.

Положение(я)	Описание	Длина	Последовательность AA
1 – 54	Внеклеточный домен	54	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIP CQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTN SVKGTNA (SEQ ID NO: 395)
55 – 77	Трансмембранный домен	23	ILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLL (SEQ ID NO: 396)
78 – 184	Цитоплазматический домен	107	RKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMA NIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEE CTCEDCIKSKPKVDSDFCFPLPAM EEGATILVTTKTNDYCKSLPAALS ATEIEKSISAR (SEQ ID NO: 397)

Эпитопные пептиды ВСМА (269EP001-269EP007) были сконструированы так, как продемонстрировано на Фиг. 8В и в Таблице 10, и химически синтезированы и биотинилированы на N-конце. Аффинности связывания V_HH1-hIgG1Fc или V_HH2-hIgG1Fc определяли с помощью ИФА. Вкратце, описанные выше пептиды наносили на планшет MAXISORP™ ELISA в количестве 1 мкМ на ночь при 4°C. На следующий день планшеты промывали PBST (добавляли 0,5% ТВИН-20) дважды, а затем планшет блокировали с помощью 0,5% BSA при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты затем дважды промывали PBST с последующим добавлением серийно разведенного V_HH1hIgG1Fc или V_HH2-hIgG1Fc в концентрации 10 нМ в трех повторениях, затем инкубировали при 4°C в течение 2 часов. Планшеты затем промывали 3 раза холодным PBST, после чего в каждую лунку добавляли козье анти-Llama-HRP (1: 1500, Bethyl Lab# A160) и дополнительно инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты затем промывали 4 раза PBST, в каждую лунку добавляли субстраты ТМВ и инкубировали при комнатной температуре в течение 10-30 мин. Затем планшеты считывали на считывающем устройстве для микропланшетов TECAN® 10M с абсорбцией при 450 нм.

Таблица 10. Последовательности эпитопного пептида ВСМА.

Эпитоп	Положения	Последовательность аминокислотных остатков	Длина
269EP001	1-10	MLQMAGQCSQ (SEQ ID NO: 388)	10
269EP002	8-21	CSQNEYFDSLHAC (SEQ ID NO: 389)	14
269EP003	11-23	NEYFDSLHACIP (SEQ ID NO: 390)	13
269EP004	20-30	ACIPCQLRCSS (SEQ ID NO: 391)	11
269EP005	24-42	CQLRCSSNTPPLTCQRYCN (SEQ ID NO: 392)	19
269EP006	36-43	LTCQRYCNAS (SEQ ID NO: 393)	10
269EP007	43-54	ASVTNSVKGTNA (SEQ ID NO: 394)	12

Как проиллюстрировано на Фиг. 9А, V_HH1 продемонстрировал самое сильное связывание с пептидом 269EP005, после чего - с пептидом 269EP004. Однако связывание V_HH1 с 269EP003 и 269EP006 было относительно слабым по сравнению с 269EP005 и 269EP004. V_HH1 имеет тенденцию связывать эпитоп, расположенный в пептиде 269EP005 (то есть аминокислота 24-36 ВСМА ECD), который содержит вторичные структуры спирали (aa24-27), бета-цепь (aa30-32) и спираль (aa35-37).

Как проиллюстрировано на Фиг. 9В, V_HH2 продемонстрировал самое сильное связывание с пептидом 269EP002, после чего с пептидом 269EP003. Однако связывание V_HH1 с 269EP001 и 269EP004 было относительно слабым по сравнению с 269EP002 и 269EP003. В то время как первая бета-цепь (aa12-15) и бета-цепь (aa20-23) ВСМА ECD в основном расположены в последовательности, охватываемой 269EP002 (aa8-21) и 269EP003 (aa11-23), V_HH2 имеет тенденцию связываться с эпитопом, расположенным в первых двух бета-цепях.

Анализ конкурентного связывания

и Дифференциальное связывание V_HH1 и V_HH2 с эпитопом дополнительно проверяли с помощью конкурентного клеточного анализа связывания. В анализе применяли стабильную линию клеток CHO, экспрессирующую ВСМА человека ("CHOBCMA").

Вкратце, клетки CHO-BCMA в количестве $0,5 \times 10^6$ предварительно инкубировали с 12,5 нг/мл LAV001 (который содержит 6xHis тег на С-конце) при 4 °С в течение 0,5 часа в двух повторениях. Затем к каждой лунке планшета добавляли серийно разведенное рекомбинантное антитело V_HH2-hIgG1Fc и дополнительно инкубировали при 4 °С в течение еще 1 часа. После инкубации клетки промывали с помощью 500 мкл ФСБД и центрифугировали при 300 г в течение 10 мин. Клеточный осадок повторно

суспендировали в ФСБД, содержащем анти-His тег-FITC (1:200, номер по каталогу в GenScript: A16020), затем клетки промывали с помощью 500 мкл ФСБД и центрифугировали при 300 г в течение 10 мин. Клеточный осадок повторно суспендировали в ФСБД и затем подвергали анализу FACS на проточном цитометре ATTUNE™ Nxt. В качестве контроля анализа серийно разведенный V_HH2-hIgG1Fc непосредственно инкубировали с клетками CHO-BCMA без наличия LAB001, следуя идентичным процедурам для одновременного анализа, описанным выше. Для определения связывания V_HH2-hIgG1Fc с клетками CHO-BCMA применяли козье антитело против человеческого IgG (Fc-специфическое)-FITC (Sigma Aldrich Cat: F9512). Как проиллюстрировано на Фиг. 10, V_HH2-hIgG1Fc самостоятельно связывается с CHO-BCMA дозозависимым образом. Однако V_HH2-hIgG1Fc не смог конкурировать со связыванием V_HH1-His с клетками CHO-BCMA, что указывает на различные участки связывания V_HH1 и V_HH2 на BCMA.

Пример 5. Эффективность LCAR-B38M CAR-T в модели ксенотрансплантата опухоли у мышей *in vivo*

Противоопухолевую эффективность LCAR-B38M CAR-T-клеток *in vivo* оценивали в модели мыши NCG (NOD-Prkdc^{em26Cd52}Il2rg^{em26Cd22}/NjuCr1) с ксенотрансплантатом опухоли множественной миеломы. LCAR-B38M CAR представляет собой двухвалентный BCMA CAR, имеющий два домена анти-BCMA V_HH, которые нацелены на различные эпитопы BCMA.

Модель мыши NCG создавали путем последовательного редактирования CRISPR/Cas9 локусов Prkdc и Il2rg в организме мыши NOD/Nju, получая таким образом мышью, коизогенную для NOD/Nju. Мышь NOD/Nju несет мутацию в гене Sirpa (SIRP α), что позволяет приживлять чужеродные кроветворные стволовые клетки. Нокаут Prkdc генерирует SCID-подобный фенотип с нарушением образования Т-клеток и В-клеток. Нокаут гена Il2rg еще более усугубляет SCID-подобный фенотип, а также приводит к уменьшению продукции НК-клеток. Таким образом, мышью NCG представляет собой линию мышей с "тройным иммунодефицитом", которые являются в большей степени иммуноскомпрометированы, чем обычно используемые линии мышей с иммунодефицитом, включая SCID и бестимусных мышей.

Prkdc и Il2rg являются частью семейства генов SCID (тяжелого комбинированного иммунодефицита), влияющих на созревание и образование Т-клеток, В-клеток, НК-клеток и, в меньшей степени, дендритных клеток. Prkdc кодирует каталитическую субъединицу ДНК-зависимого фермента протеинкиназы, которая необходима для рекомбинации V(D)J,

процесса, являющегося необходимым для обеспечения разнообразия антител в созревающих Т- и В-клетках. *IL2rg* кодирует общую субъединицу гамма, обнаруженную в *IL-2* и множественных *IL*-рецепторах (*IL-4*, *IL-7*, *IL-9*, *IL-15* и *IL-21*), которые необходимы для индуцирования опосредуемой цитокином передачи сигналов для созревания незрелых лимфоцитов (например, Т-, В- и NK-клеток) и других лейкоцитов.

LCAR-B38M CAR-T-клетки получали с применением Т-клеток от различных доноров с целью скрининга на предмет обнаружения источника Т-клеток, обеспечивающего CAR-T с наивысшей эффективностью уничтожения клеток RPMI8226.Luc *in vitro* (Фиг. 11). На основании результатов, приведенных на Фиг. 11, LCAR-B38M CAR-T-клетки получали с применением Т-клеток выбранного донора для анализа животных *in vivo*. На Фиг. 12А проиллюстрирована дозозависимая цитотоксичность *in vitro* этого массива LCAR-B38M CAR-T-клеток. Для создания ксенотрансплантата опухоли, мышам NCG внутривенно вводили клетки RPMI8226.Luc. Спустя 14 дней мышам с привитыми опухолями вводили LCAR-B38M CAR-T-клетки или нетрансдуцированные Т-клетки, а затем осуществляли биолюминесцентную визуализацию *in vivo* (BLI).

Как проиллюстрировано на ФИГ. 12В-12С, LCAR-B38M CAR-T-клетки были эффективны для эрадикации привитых опухолевых клеток RPMI8226.Luc у мышей NCG и для выживания мышей, тогда как большинство мышей в группе контроля (UnT) погибли в течение 4 недель. Представляет интерес тот факт, что при аутопсии в печени всех мышей в группе UnT наблюдали многочисленные метастатические опухоли. Это наблюдение дополнительно подтверждалось посредством оценки активности люциферазы *in vivo* из образцов опухоли (Фиг. 12D-12E). Напротив, у мышей, получавших LCAR-B38M CAR-T метастатических опухолей в печени не было. Таким образом, исследование *in vivo* демонстрирует активность LCAR-B38M CAR-T-клеток при элиминации клеток множественной миеломы (например, RPMI8226.Luc) у мышей NCG.

Пример 6. Исследование безопасности применения LCAR-B38M CAR-T у нечеловекообразных приматов

Безопасность LCAR-B38M CAR-T-клеток *in vivo* оценивали в модели яванского макака. МКПК получали из образцов периферической крови двух обезьян (NHP#120117 и NHP#120545, обое - самцы, около 4 кг) и готовили посредством центрифугирования в градиенте плотности. Т-клетки яванского макака выделяли из МКПК с применением набора для выделения Т-клеток у нечеловекообразных приматов Miltenyi Pan

(Miltenyi#130-091-993) согласно протоколу производителя. Подготовленные Т-клетки обезьян предварительно активировали с помощью набора для активации/размножения Тклеток нечеловекообразных приматов (Miltenyi # 130-092-919), IL-2 человека и аутологичной сыворотки обезьян в течение 3 дней. После этого предварительно активированные Т-клетки трансдуцировали лентивирусом LCAR-B38M с последующим размножением в течение 10 дополнительных дней.

За 3 дня до инфузии аутологичных CAR-T-клеток обезьянам предварительно вводили циклофосфамид в дозе 22 мг/кг массы тела путем внутривенной инфузии. В день аутологичной инфузии клетки оттаивали на водяной бане с температурой 37 °С путем осторожного перемешивания круговыми движениями и сразу же внутривенно вводили животным в течение не более 5 минут. Обезьяне NHP#120117 вводили 5×10^6 /кг CAR-Тклеток, а обезьяне NHP#120545 вводили 4×10^7 /кг CAR-T-клеток.

Обезьян контролировали после введения Т-клеток на предмет лихорадки, респираторного дистресса, изменения аппетита, диареи и потери веса. Образцы крови, отобранные до и после введения Т-клеток, подвергали ОАК, биохимическому анализу сыворотки и определению уровня цитокинов. Как проиллюстрировано на ФИГ. 13А-13F, CAR-T-клетки не характеризовались значительной токсичностью у обезьян.

Пример 7. Клиническое исследование LCAR-B38M CAR-T у пациентов-людей с рефрактерной/рецидивирующей множественной миеломой

Для определения безопасности и эффективности LCAR-B38M CAR-T-клеток для лечения пациентов с диагнозом рефрактерной или рецидивирующей множественной миеломы (“r/r MM”) было проведено несравнительное, открытое, мультицентровое, клиническое исследование фазы 1/2. Информацию о клиническом исследовании можно найти во всеобщем доступе по адресу: web.clinicaltrials.gov, с идентификатором NCT03090659.

В этом исследовании пациентов с рефрактерной/рецидивирующей множественной миеломой лечили с помощью LCAR-B38M CAR-T-клеток, полученных из аутологичных Т-клеток пациентов. Общую дозу $0,5 \times 10^6$ - 5×10^6 клеток/кг массы тела вводили каждому пациенту путем внутривенной инъекции в трех дробных дозах (20 %, 30 % и 50 % соответственно) в течение недели (например, в Дни 0, 2 и 6). В течение Дней 1-30 исследования пациентов контролировали на предмет возникновения нежелательных явлений, и получали образцы пациентов для лабораторной оценки. Все пациенты наблюдались в течение по меньшей мере 36 месяцев после введения CAR-T.

Первичный результат исследования оценивает возникновение нежелательных явлений, связанных с лечением, которые анализируют согласно Общим терминологическим критериям нежелательных явлений (CTCAE) v4. 0 в течение 1-30 дней после инъекции LCAR-B38M CAR-T-клеток. Вторичный результат оценивает ответные реакции на лечение миеломы, индуцированные CAR-T, например, путем определения отклоняющихся от нормы уровней иммуноглобулина в сыворотке и числа клеток множественной миеломы в костном мозге пациентов до и после введения LCARB38M CAR-T-клеток. Цели эффективности исследования включают долю Полного ответа по результатам лабораторного исследования, 3-летнюю выживаемость без признаков заболевания, 3-летнюю выживаемость без прогрессирования.

Пациенты в возрасте 18-75 лет могли принимать участие в исследовании, если: (1) пациент имеет подтвержденный ранее диагноз активной множественной миеломы, что определено обновленными критериями IMWG; (2) с помощью проточной цитометрии или иммуногистохимии обнаруживается четкая экспрессия ВСМА на злокачественных плазменных клетках из костного мозга или плазмцитомы; и (3) пациент имеет рефрактерную множественную миелому, что определено получением по меньшей мере 3 предшествующих курсов лечения, включая бортезомиб, или иным образом идентифицированную врачами-клиницистами; или у пациента наблюдается рецидив множественной миеломы, что определено руководящими принципами для клинической практики в онкологии NCCN: Множественная миелома (2016 V2).

Из исследования исключались следующие пациенты: (1) женщины, способные к деторождению, или беременные или кормящие грудью; (2) пациенты с активной и неконтролируемой инфекцией: гепатит В, гепатит С, ВИЧ или другая смертельная вирусная и бактериальная инфекция; (3) пациенты, получавшие системную терапию кортикостероидами в дозе более 5 мг/сут преднизона или эквивалентную дозу другого кортикостероида, не допускаются в пределах 2 недель либо до требуемого лейкофереза, либо до инициирования адаптационного режима химиотерапии; (4) пациенты с любым неконтролируемым интеркуррентным заболеванием или серьезным неконтролируемым патологическим состоянием; (5) пациенты с метастазами в ЦНС или симптоматическими поражениями ЦНС (включая черепные невралгии или массивные поражения и компрессию спинного мозга); (6) пациенты с аллогенной трансплантацией стволовых клеток в анамнезе, которые имеют активную острую или хроническую болезнь "трансплантат против хозяина" (БТПХ) или нуждаются в иммунодепрессантах по поводу БТПХ, в пределах 6 месяцев до участия в исследовании; или (7) пациенты с активными

аутоиммунными кожными заболеваниями, такими как псориаз или другие активные аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит.

При промежуточном анализе в мае 2017 года, 35 пациентов с рецидивирующей или резистентной (рефрактерной) множественной миеломой получали лечение с применением LCAR-B38M CAR-T. Первые признаки эффективности лечения появились уже через 10 дней после первой инъекции CAR-T-клеток. В целом, показатель частоты объективного ответа составил 100 %, и 33 пациента из 35 (94 %) достигли очевидной клинической ремиссии миеломы (полный ответ или очень хороший частичный ответ) в течение двух месяцев лечения с применением CAR-T-клеток.

К моменту проведения анализа, 19 пациентов наблюдались в течение более четырех месяцев, что является предварительно установленным периодом времени для полной оценки эффективности по консенсусным критериям Международной группы по изучению множественной миеломы (IMWG). Один пациент достиг частичного ответа, и четыре пациента достигли критериев очень хорошей частичной ремиссии (VgPR) относительно эффективности. Ни у кого из пациентов, достигших критериев строгого полного ответа ("сПО"), не было рецидивов. Пять пациентов, которых наблюдали более года (12-14 месяцев), оставались в статусе сПО и не имели минимального остаточного заболевания (то есть раковые клетки в костном мозге не обнаруживались).

Синдром высвобождения цитокинов ("СВЦ") является распространенным и потенциально опасным побочным эффектом терапии CAR T-клетками. Только транзиторный СВЦ регистрировался у 85 % из 35 пациентов. Симптомы СВЦ включают лихорадку, низкое кровяное давление, затрудненное дыхание и нарушения функции множества органов. У большинства пациентов симптомы СВЦ были легкой степени тяжести и контролируемы. Только у двух пациентов наблюдался серьезный СВЦ (класс 3), но он купировался после приема тоцилизумаба (воспалительно-восстановительное лечение, обычно применяемое при развитии СВЦ в клинических исследованиях терапии CAR-T -клетками). Ни у одного из пациентов не наблюдались неврологические побочные эффекты, являющиеся еще одним распространенным и серьезным осложнением терапии CAR-T -клетками.

Промежуточные данные клинических исследований демонстрируют сильную эффективность и безопасность лечения с применением LCAR-B38M CAR-T у пациентов с рефрактерной/рецидивирующей множественной миеломой.

В пилотном клиническом исследовании 3 пациента получали аутологичные Тклетки, экспрессирующие одновалентный BCMA CAR, то есть LCAR-B27S CAR-

Тклетки. LCAR-B27S CAR (один моновалентный ВСМА CAR, указанный в Таблице 4) имеет антигенсвязывающий домен, содержащий одиночный фрагмент $V_{\text{H}}\text{H}$, который распознает одиночный эпитоп молекулы ВСМА. Этот домен $V_{\text{H}}\text{H}$ идентичен второму домену $V_{\text{H}}\text{H}$ двухэпитопного/двухвалентного LCAR-B38M CAR.

Для анализа цитотоксичности *in vitro* LCAR-B27S CAR-Т-клетки получали от трех пациентов с множественной миеломой соответственно, а LCAR-B38M CAR-Т-клетки также получали соответственно от тех же трех пациентов с множественной миеломой в качестве контроля. Оба типа CAR-Т-клеток совместно культивировали с клетками RPMI8226.Luc при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней (соотношение Э/М) 20:1 и 5:1 в течение 20 часов. Как проиллюстрировано на Фиг. 14А, CAR-Т-клетки получали с применением Т-клеток от пациента А. Процент оставшихся жизнеспособных клеток, оцениваемый по остаточной активности люциферазы в клетках RPMI8226.Luc, составлял 3,97 плюс/минус 0,75 % для LCAR-B38M и 3,17 плюс/минус 0,57 % для LCARB27S, при этом соотношение Э/М составляло 20:1. Однако, когда соотношение Э/М составляло 5:1, LCAR-B38M продемонстрировал более высокий потенциал уничтожения клеток RPMI8226.Luc по сравнению с LCAR-B27S (33,37 плюс/минус 0,75 % оставшихся жизнеспособных клеток для LCAR-B38M, 68,60 плюс/минус 1,60 % для LCAR-B27S). Как проиллюстрировано на Фиг. 14В, CAR-Т-клетки получали с применением Т-клеток от пациента В. Процент оставшихся жизнеспособных клеток, оцениваемый по остаточной активности люциферазы в клетках RPMI8226.Luc, составлял 4,45 плюс/минус 0,57 % для LCAR-B38M и 9,32 плюс/минус 1,16 % для LCAR-B27S, при этом соотношение Э/М составляло 20:1. Однако, когда соотношение Э/М составляло 5:1, LCAR-B38M и в этом случае продемонстрировал более высокий потенциал уничтожения клеток RPMI8226.Luc по сравнению с LCAR-B27S (40,92 плюс/минус 3,00 % оставшихся жизнеспособных клеток для LCAR-B38M, 84,05 плюс/минус 1,56 % для LCAR-B27S). Как проиллюстрировано на Фиг. 14С, CAR-Т-клетки получали с применением Т-клеток от пациента С. Процент оставшихся жизнеспособных клеток, оцениваемый по остаточной активности люциферазы в клетках RPMI8226.Luc, составлял 2,56 плюс/минус 0,88 % для LCAR-B38M и 10,12 плюс/минус 1,83 % для LCAR-B27S, при этом соотношение Э/М составляло 20: 1. Однако, когда соотношение Э/М составляло 5:1, LCAR-B38M и в этом случае продемонстрировал более высокий потенциал уничтожения клеток RPMI8226.Luc по сравнению с LCAR-B27S (29,99 плюс/минус 3,13 % оставшихся жизнеспособных клеток для LCAR-B38M, 100,93 плюс/минус 9,25 % для LCAR-B27S).

В пилотном клиническом исследовании, 3 пациента получали LCAR-B27S CAR-Тклетки, при этом все протоколы предварительной адаптации, осуществления инъекций и наблюдения были идентичны протоколам клинического исследования с двухвалентным LCAR-B38M CAR. Общую дозу аутологичных LCAR-B27S модифицированных CAR-Тклеток, составляющую 3×10^6 клеток/кг (пациент А), 5×10^6 клеток/кг (пациент В) и 7×10^6 клеток/кг (пациент С) массы тела вводили каждому пациенту, соответственно, путем внутривенной инъекции в трех дробных дозах (20 %, 30 % и 50 % соответственно) в течение недели (например, в Дни 0, 2 и 6). В течение 1-30 дней исследования пациентов контролировали на предмет возникновения нежелательных явлений, и получали образцы пациентов для лабораторной оценки. Все пациенты наблюдались в течение по меньшей мере 36 месяцев после введения CAR-T.

Два пациента из трех пациентов достигли критериев очень хорошего частичного ответа (охЧО), но в обоих пациентов наблюдался рецидив в течение 6 месяцев после инфузии CAR-T. У третьего пациента клинического ответа не было. Поэтому пилотное исследование с LCAR-B27S было прекращено ЭСО (IRB) без дополнительного вовлечения пациентов.

Показатели частоты объективного ответа, частоты полной ремиссии и частоты рецидивов в этом пилотном исследовании одновалентного ВСМА CAR (LCAR-B27S) и в исследовании двухвалентного ВСМА CAR (LCAR-B38M CAR-T) приведены в Таблице 11 ниже. Двухвалентный ВСМА CAR-T превосходил по клинической эффективности одновалентный ВСМА CAR-T.

Таблица 11. Сопоставимые клинические данные терапии одновалентным и двухвалентным/двухэпитопным ВСМА CAR-T

Агент	n	Доза (клеток/кг)	Клиническое исследование	Частота объективного ответа (ЧОО)	Частота полной ремиссии (ЧПР)	Частота рецидива (более 6 мес)
Одновалентный ВСМА CAR-T (LCAR-B27S)	3	3, 5, 7×10^6 соответственно	Пилотное исследование	67 %	0 %	67 %

Двухвалентный/двухэпитопный ВСМА CAR-T (LCAR-B38M)	35	$0,3 \times 10^6$ - $5,6 \times 10^6$ (медиана равна $2,9 \times 10^6$)	NCT03090659	100 %	57,1 %	7,5 %
--	----	---	-------------	-------	--------	-------

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лентивирусный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую мультивалентный химерный антигенный рецептор (CAR), в котором мультивалентный CAR содержит полипептид, который содержит:

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий по меньшей мере два ВСМА-связывающих фрагмента;

(b) трансмембранный домен; и

(c) внутриклеточный сигнальный домен,

в котором каждое первое анти-ВСМА sdAb и второе анти-ВСМА sdAb представляет собой $V_{H}H$, и в котором первое анти-ВСМА sdAb содержит CDR1, CDR2 и CDR3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124, и второе анти-ВСМА sdAb содержит CDR1, CDR2 и CDR3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117.

2. Аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка, содержащая мультивалентный химерный антигенный рецептор (CAR) или нуклеотидную последовательность, кодирующую мультивалентный химерный антигенный рецептор (CAR), в котором мультивалентный CAR содержит полипептид, который содержит:

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий по меньшей мере два ВСМА-связывающих фрагмента;

(b) трансмембранный домен; и

(c) внутриклеточный сигнальный домен,

в котором каждое первое анти-ВСМА sdAb и второе анти-ВСМА sdAb представляет собой $V_{H}H$, и в котором первое анти-ВСМА sdAb содержит CDR1, CDR2 и CDR3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124, и второе анти-ВСМА sdAb содержит CDR1, CDR2 и CDR3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117.

3. Лентивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по п. 1 или п.2, в которой:

(i) первое анти-ВСМА sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86; и

(ii) второе анти-ВСМА sdAb содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; CDR2, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 41; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79.

4. Лентивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 1-3, в которой первое анти-BCMA sdAb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, и второе анти-BCMA sdAb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117.

5. Лентивирусный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую мультивалентный химерный антигенный рецептор (CAR), в котором мультивалентный CAR содержит полипептид, который содержит:

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый BCMA-связывающий фрагмент и второй BCMA-связывающий фрагмент, в котором первый BCMA-связывающий фрагмент представляет собой первое анти-BCMA однодоменное антитело (sdAb), и второй BCMA-связывающий фрагмент представляет собой второе анти-BCMA sdAb;

(b) трансмембранный домен; и

(c) внутриклеточный сигнальный домен,

в котором первое анти-BCMA sdAb, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, и второе анти-BCMA sdAb, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117.

6. Аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка, содержащая мультивалентный химерный антигенный рецептор (CAR) или нуклеотидную последовательность, кодирующую мультивалентный химерный антигенный рецептор (CAR), в котором мультивалентный CAR содержит полипептид, который содержит:

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый BCMA-связывающий фрагмент и второй BCMA-связывающий фрагмент в котором первый BCMA-связывающий фрагмент представляет собой первое анти-BCMA однодоменное антитело (sdAb), и второй BCMA-связывающий фрагмент представляет собой второе анти-BCMA sdAb;

(b) трансмембранный домен; и

(c) внутриклеточный сигнальный домен,

в котором первое анти-BCMA sdAb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, и второе анти-BCMA sdAb, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117.

7. Lentивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 1-6, в которой первое анти-BCMA sdAb расположено на N-конце второго анти-BCMA sdAb; или в которой первое анти-BCMA sdAb расположено на C-конце второго анти-BCMA sdAb.

8. Lentивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 1-7, в которой трансмембранный домен является производным от молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1.

9. Lentивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по п. 8, в которой трансмембранный домен является производным от CD8 α или CD28.

10. Lentивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 1-9, в которой внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки.

11. Lentивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по п. 10, в которой первичный внутриклеточный сигнальный домен является производным от CD3 ζ .

12. Lentивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 1-11, в которой внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен.

13. Lentивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по п. 12, в которой костимулирующий сигнальный домен является производным от костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций, предпочтительно, CD137.

14. Lentивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по п. 13, в которой костимулирующий сигнальный домен содержит цитоплазматический домен CD28 и/или цитоплазматический домен CD137.

15. Лентивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 1-14, в которой мультивалентный CAR дополнительно содержит шарнирный домен, расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена.

16. Лентивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по п. 15, в которой шарнирный домен является производным от CD8 α .

17. Лентивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 1-16, в которой мультивалентный CAR дополнительно содержит сигнальный пептид, расположенный на N-конце полипептида.

18. Лентивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по п. 17, в которой сигнальный пептид является производным от CD8 α .

19. Лентивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 1-18, в которой мультивалентный CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 300-305.

20. Лентивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 1-19, в которой мультивалентный CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 300.

21. Лентивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 1-20, в которой нуклеотидная последовательность, выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 338-343.

22. Лентивирусный вектор или аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по любому из пп. 1-21, в которой нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность SEQ ID NO: 338.

23. Лентивирусный вектор по любому из предыдущих пунктов, в котором лентивирусный вектор представляет собой самоинактивирующийся лентивирусный вектор.

24. Аутологичная сконструированная человеческая иммунная эффекторная клетка по любому из предыдущих пунктов, в которой иммунная эффекторная клетка является Т-клеткой.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая аутологическую сконструированную иммунную эффекторную клетку по любому из предыдущих пунктов, и фармацевтически приемлемый носитель.

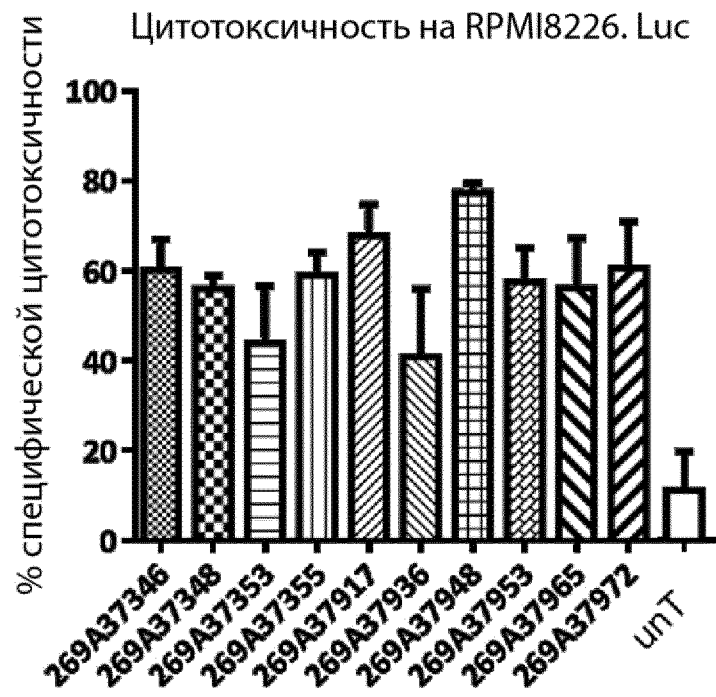
26. Способ лечения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму аутологической сконструированной иммунной эффекторной клетки по любому из предыдущих пунктов или эффективного количества фармацевтической композиции по п. 25.

27. Применение аутологической сконструированной иммунной эффекторной клетки по любому из предыдущих пунктов или фармацевтической композиции по п. 25 для лечения рака у индивидуума.

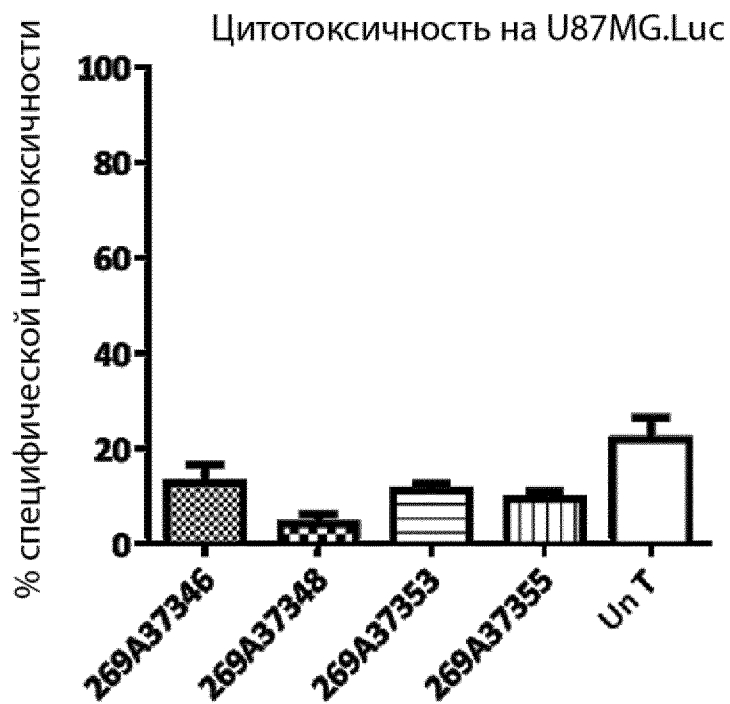
28. Применение аутологической сконструированной иммунной эффекторной клетки по любому из предыдущих пунктов или фармацевтической композиции по п. 25 в приготовлении лекарственного средства для лечения рака у индивидуума

29. Способ по п. 26, или применение по п. 27 или п. 28, в котором рак представляет собой множественную миелому.

30. Способ по п. 26, или применение по п. 27 или п. 28, в котором рак представляет собой рефрактерную или рецидивирующую множественную миелому.

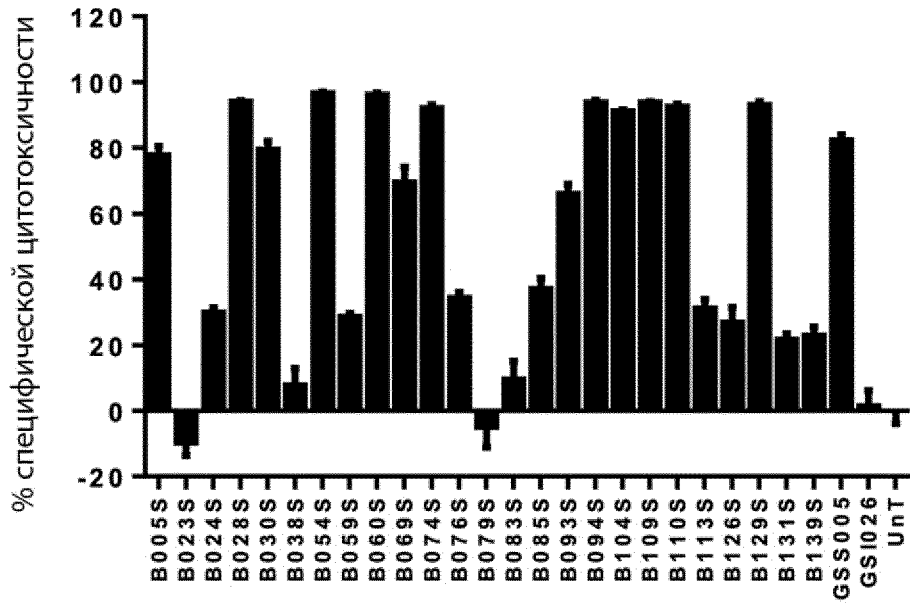


Фиг. 1А



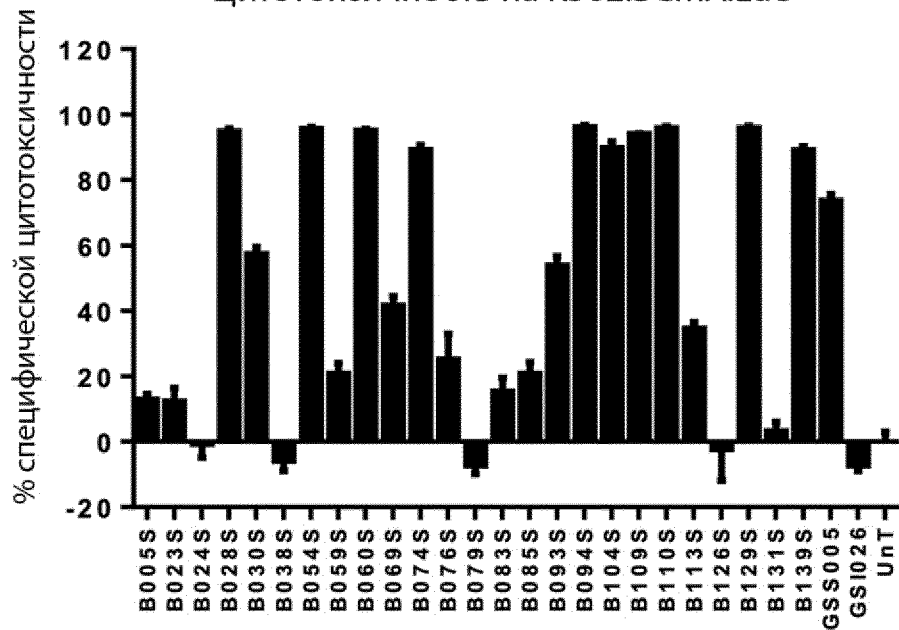
Фиг. 1В

Цитотоксичность на RPMI8226.Luc



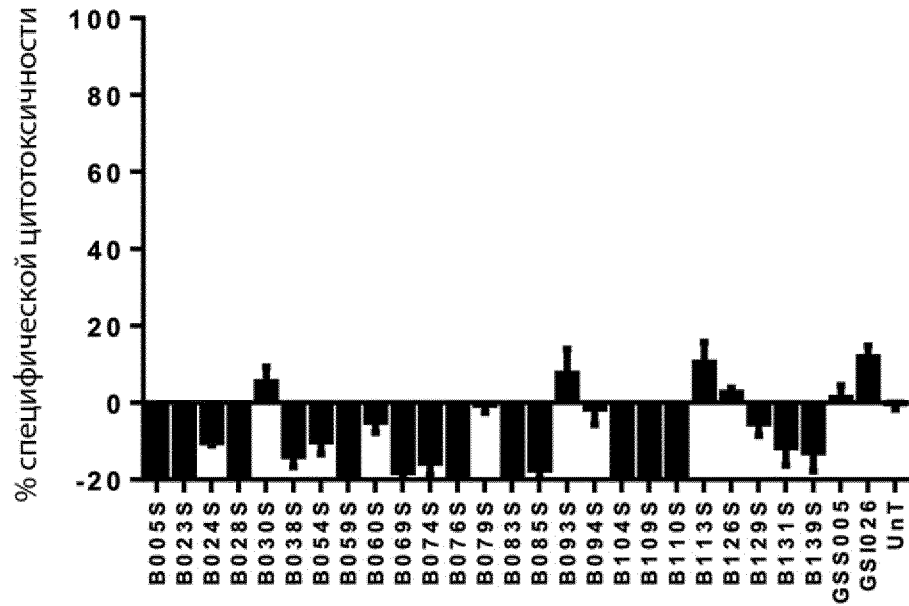
Фиг. 2А

Цитотоксичность на K562.BCMA.Luc



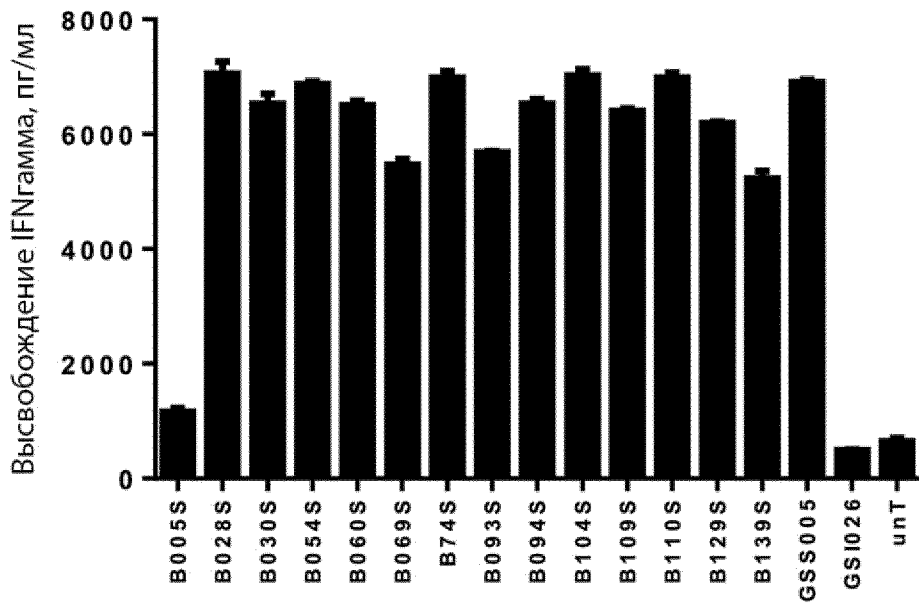
Фиг. 2В

Цитотоксичность на K562.CD19.Luc



Фиг. 2С

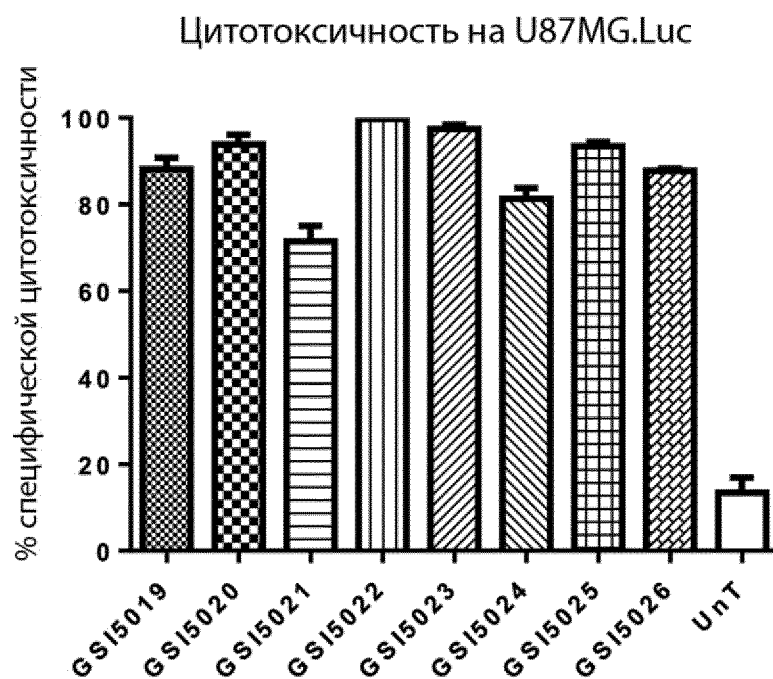
Высвобождение IFN γ на K562.BCMA.Luc



Фиг. 3

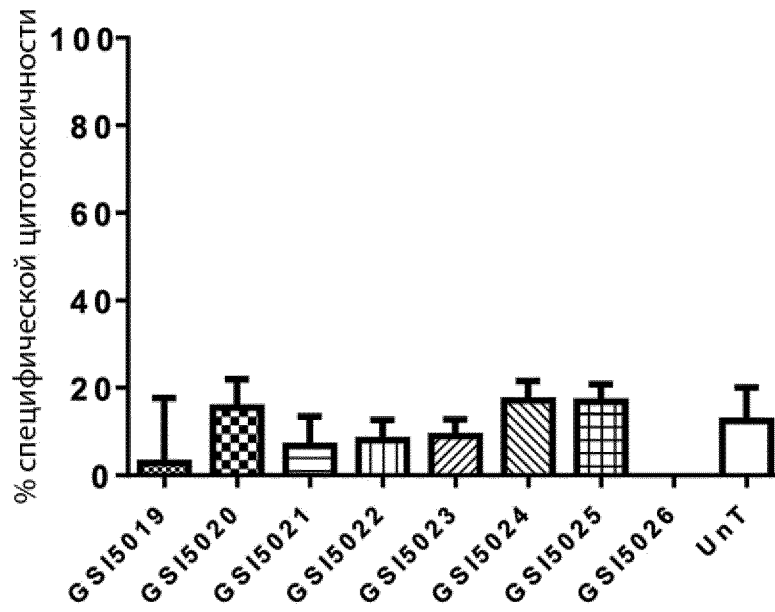


Фиг. 4А



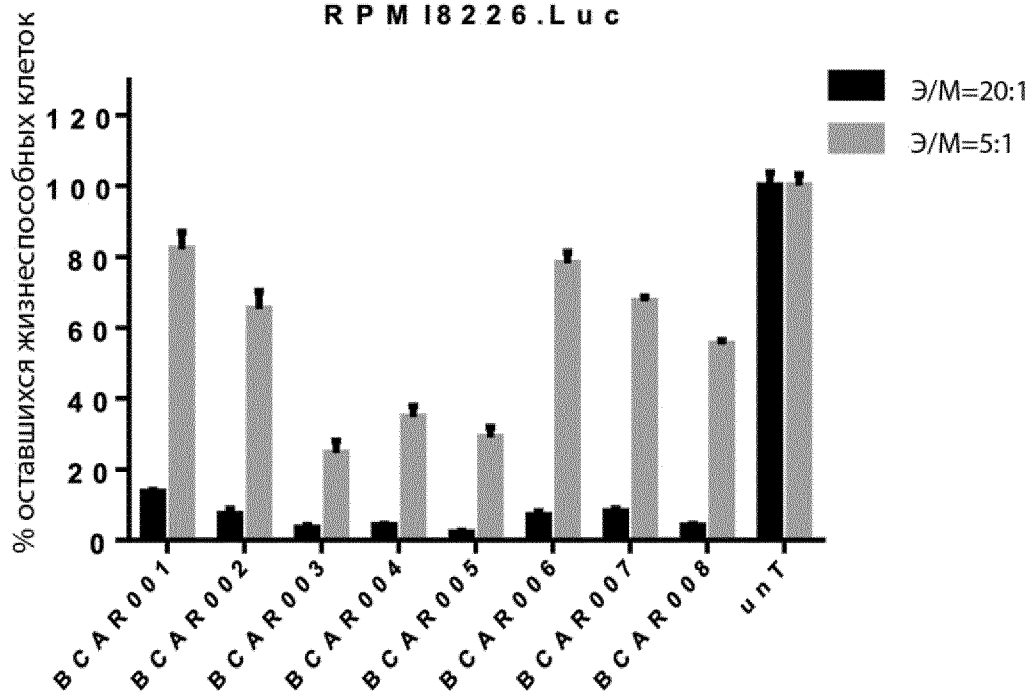
Фиг. 4В

Цитотоксичность на U87MG.Luc

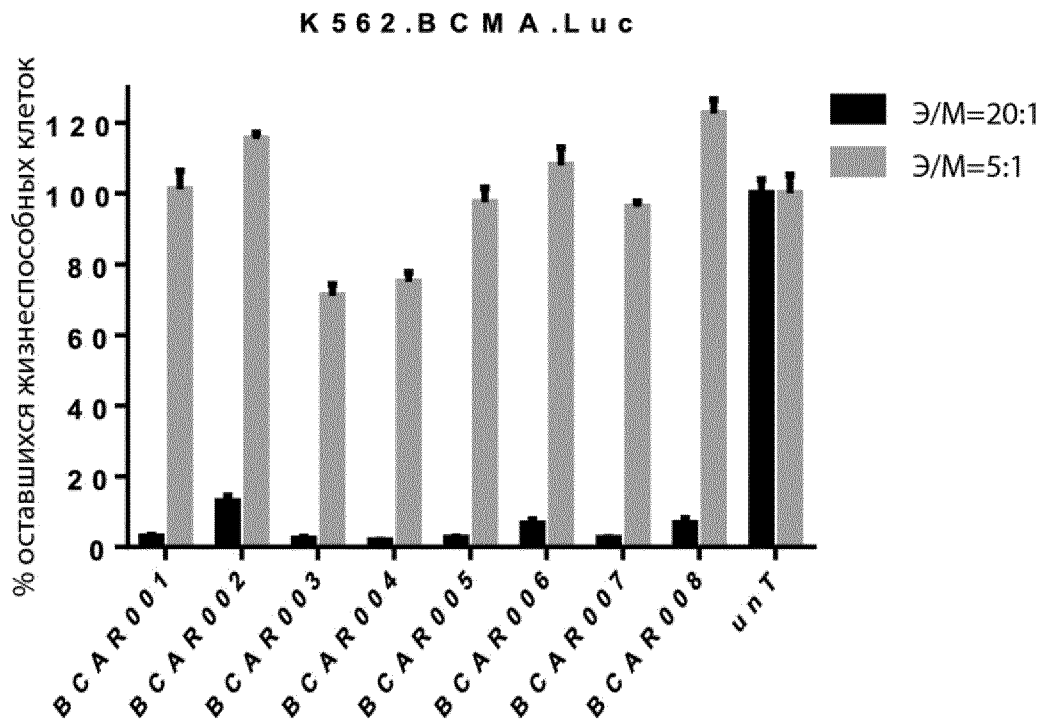


Фиг. 4С

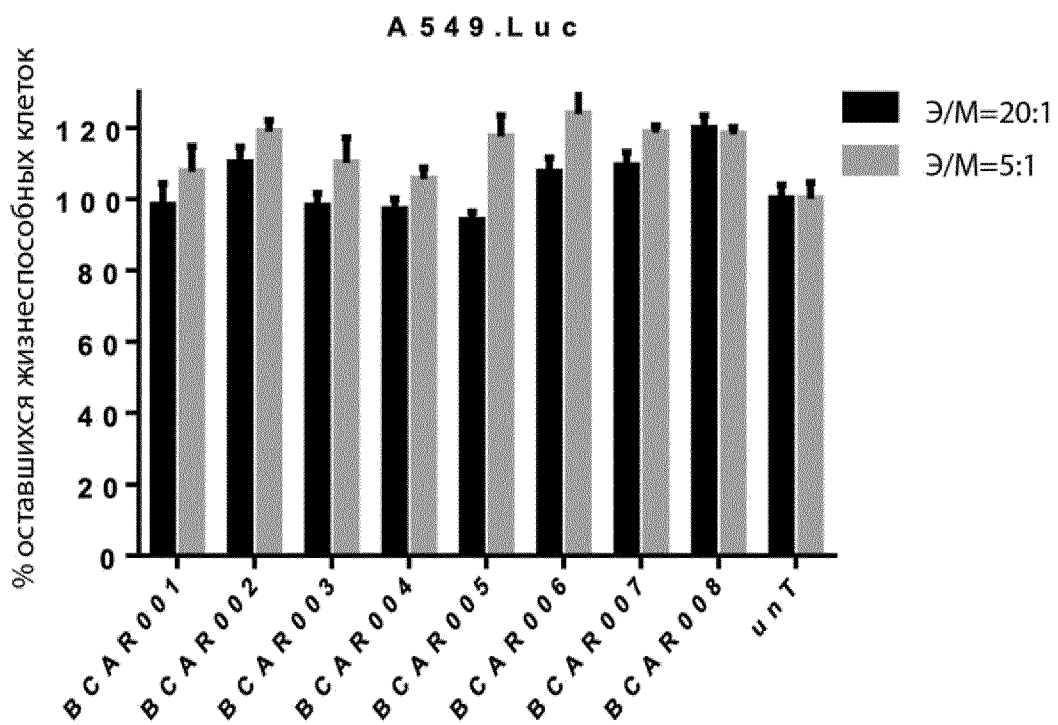
RPMI8226.Luc



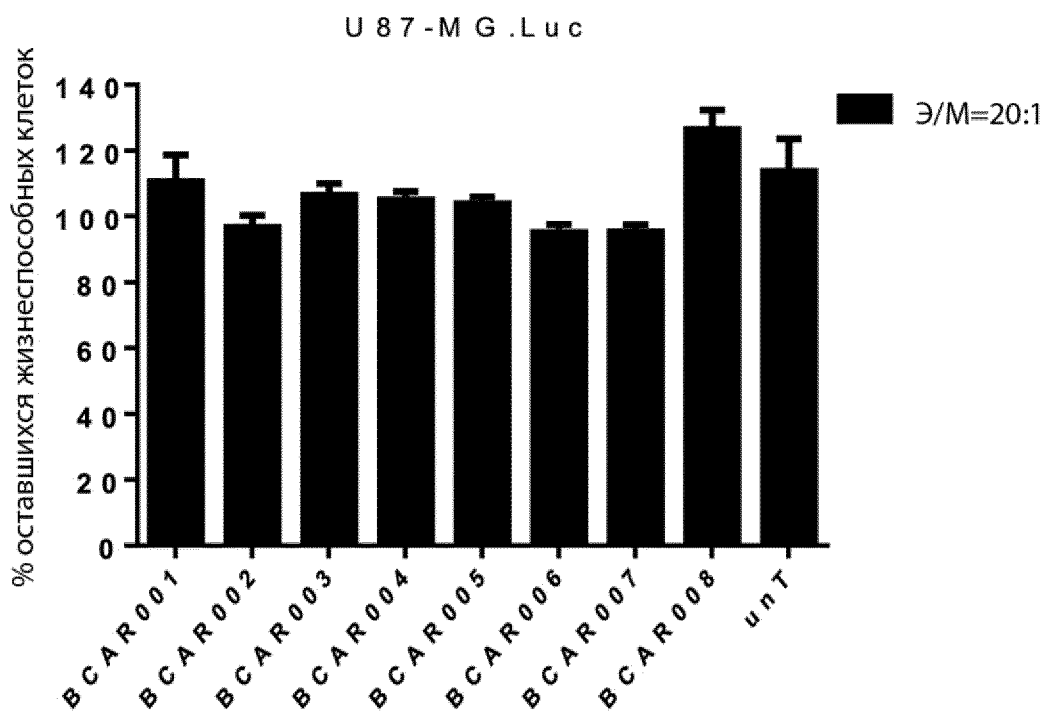
Фиг. 5А



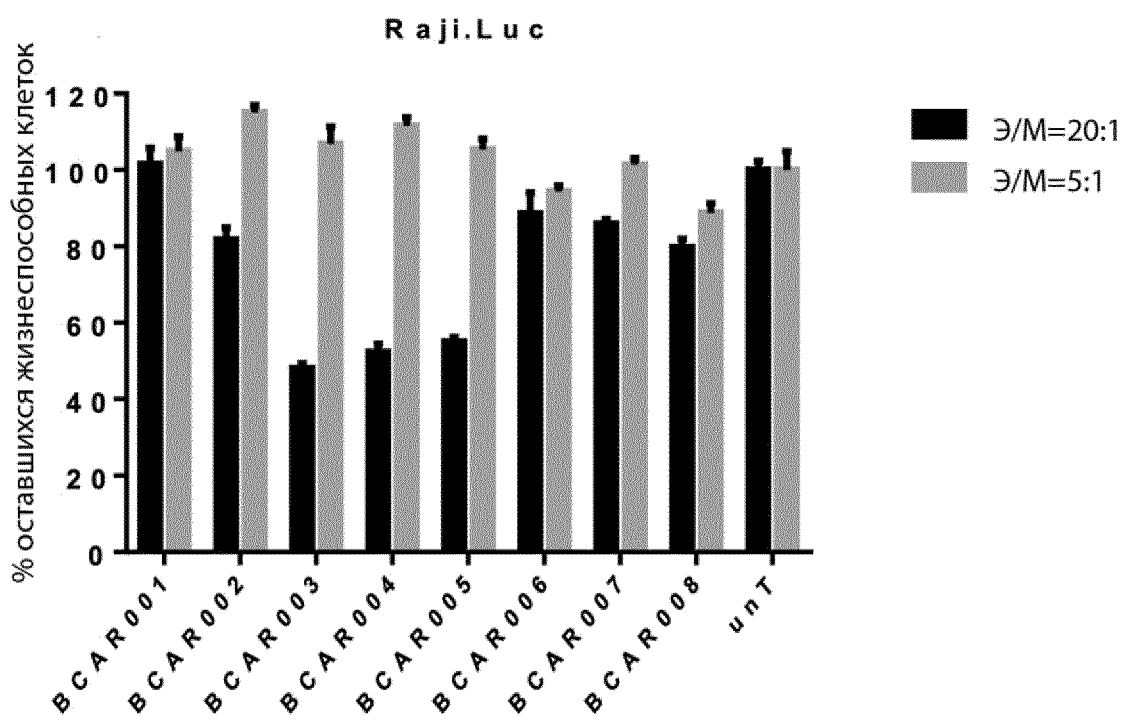
Фиг. 5В



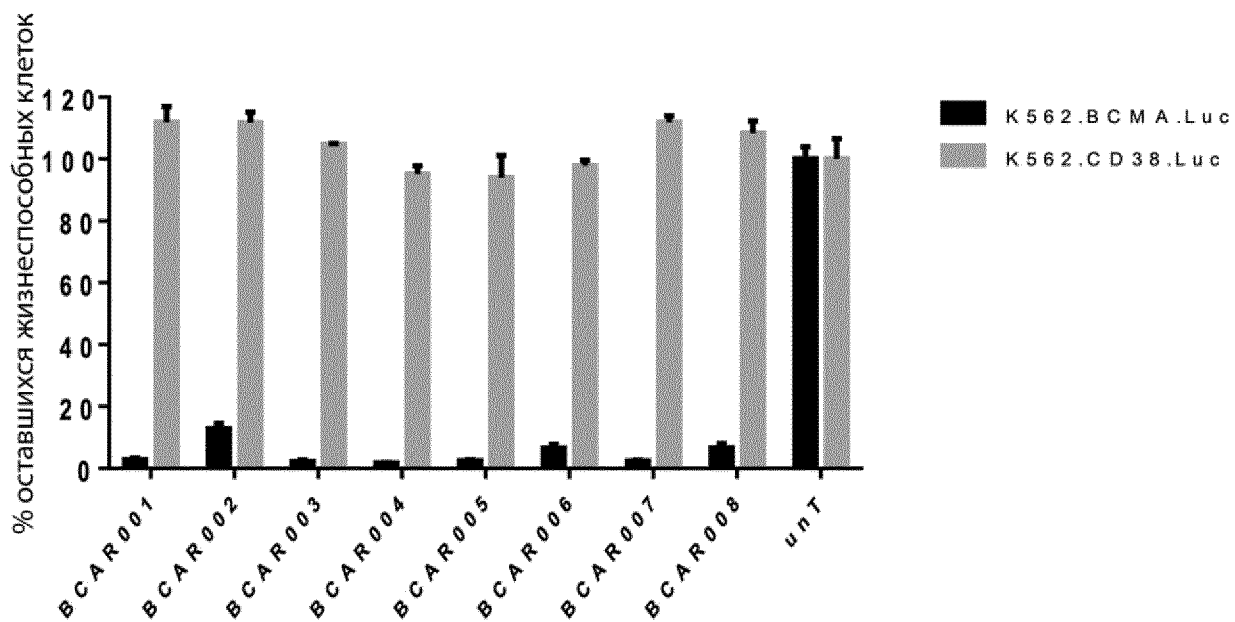
Фиг. 5С



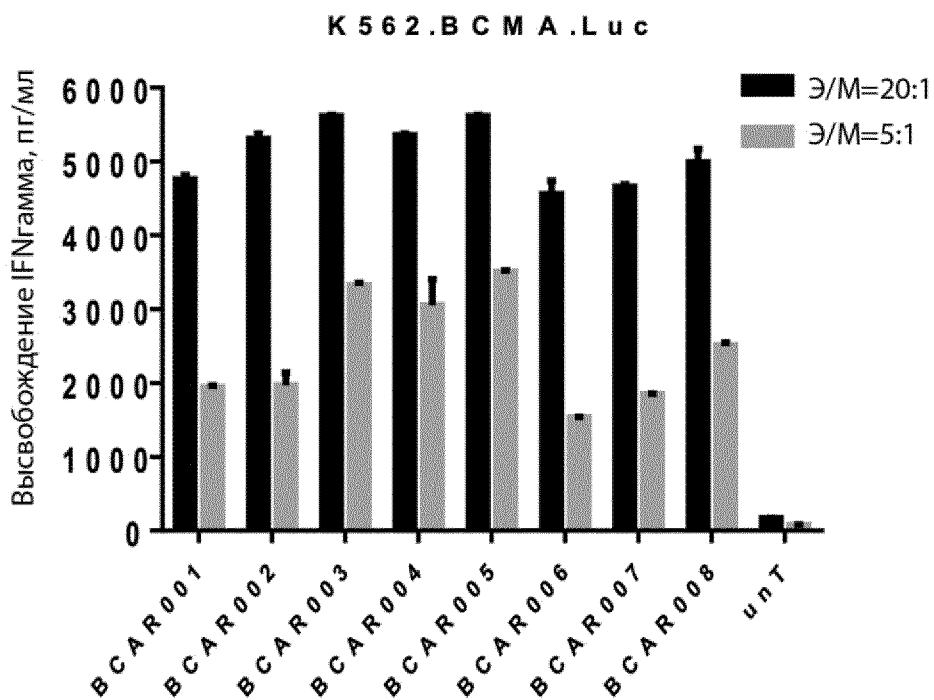
Фиг. 5D



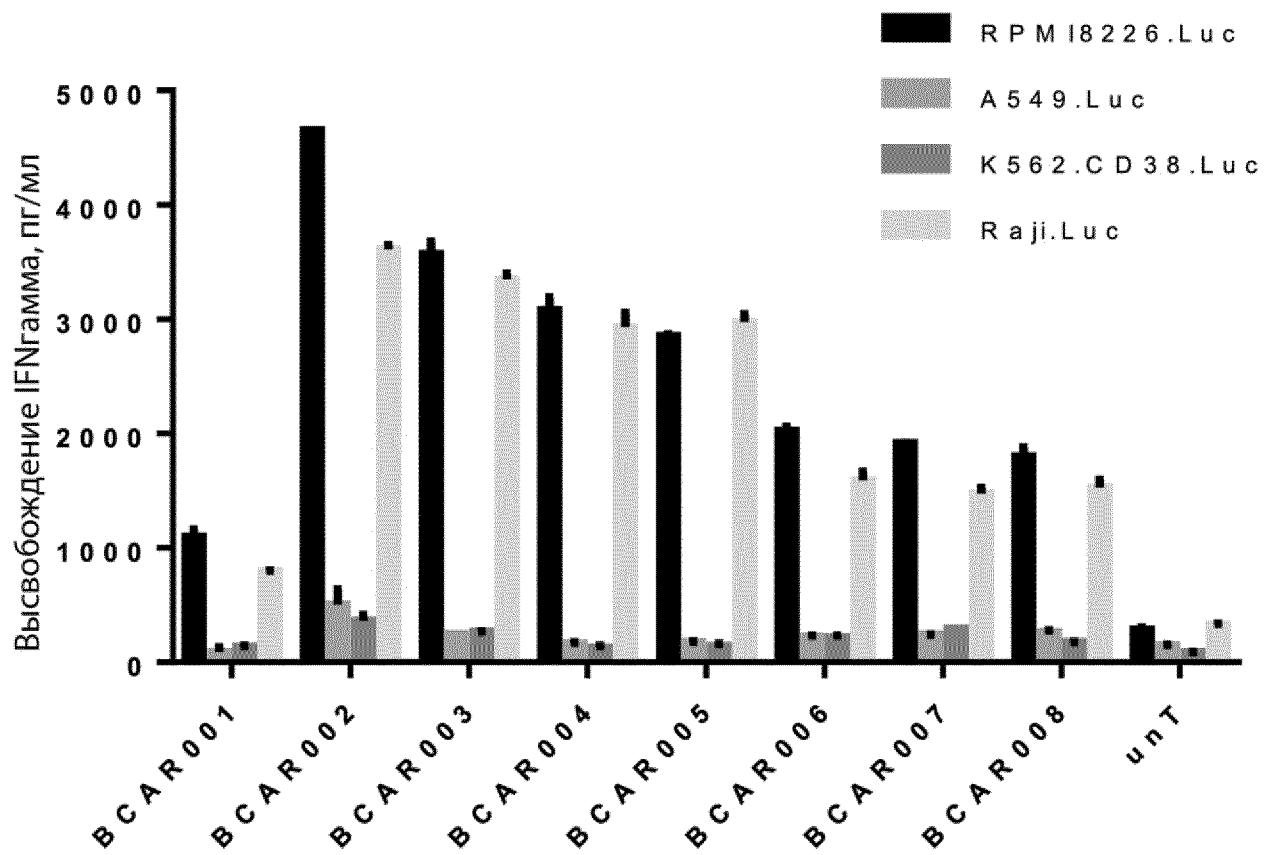
Фиг. 5E



Фиг. 5F

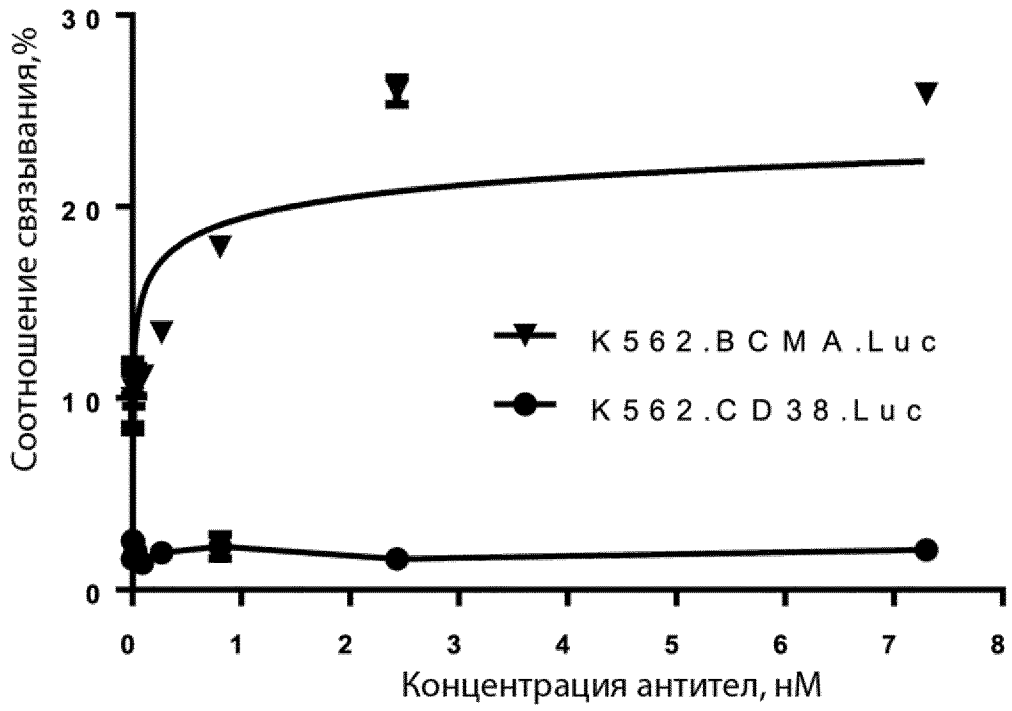


Фиг. 6А



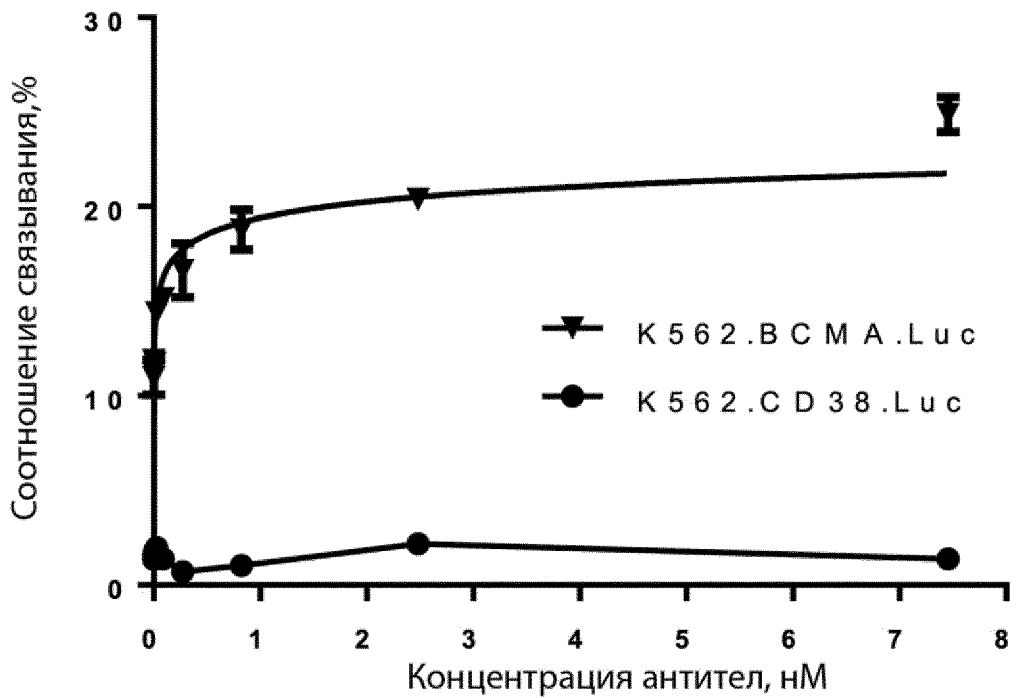
Фиг. 6В

Связывание LAB001 на клетке-мишени



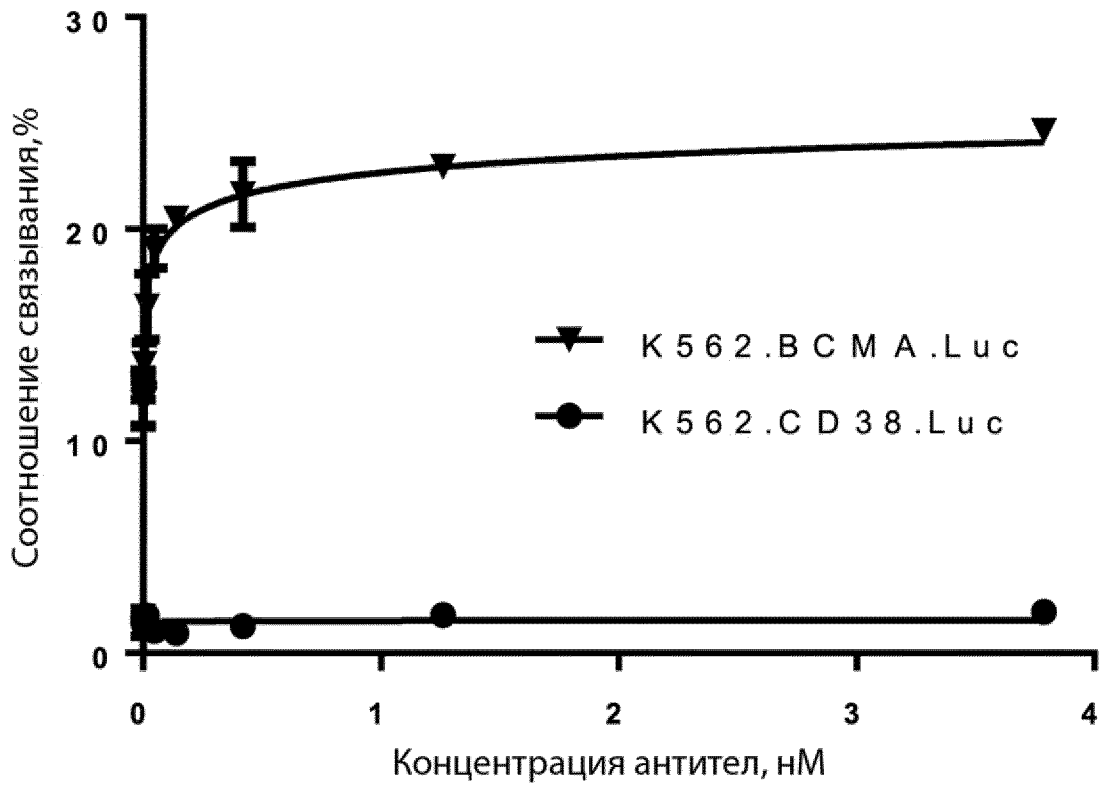
Фиг. 7А

Связывание LAB002 на клетке-мишени

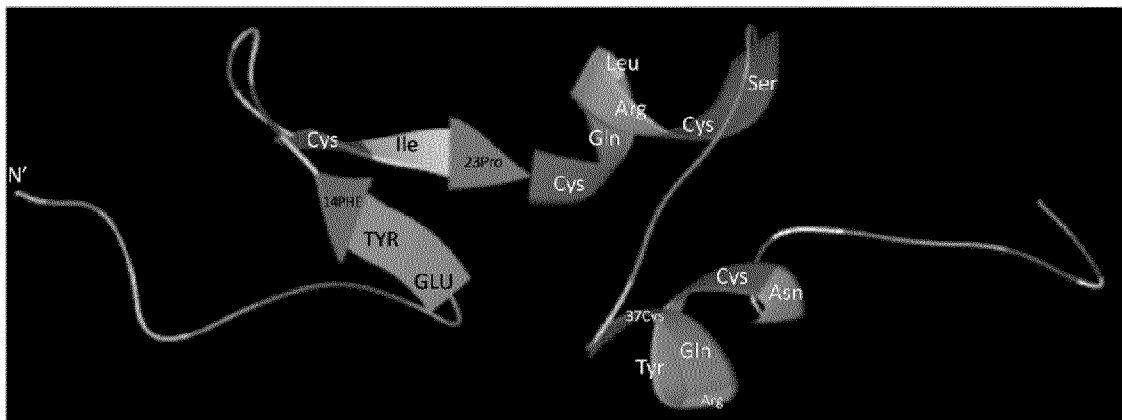


Фиг. 7В

Связывание LAB003 на клетке-мишени



Фиг. 7С

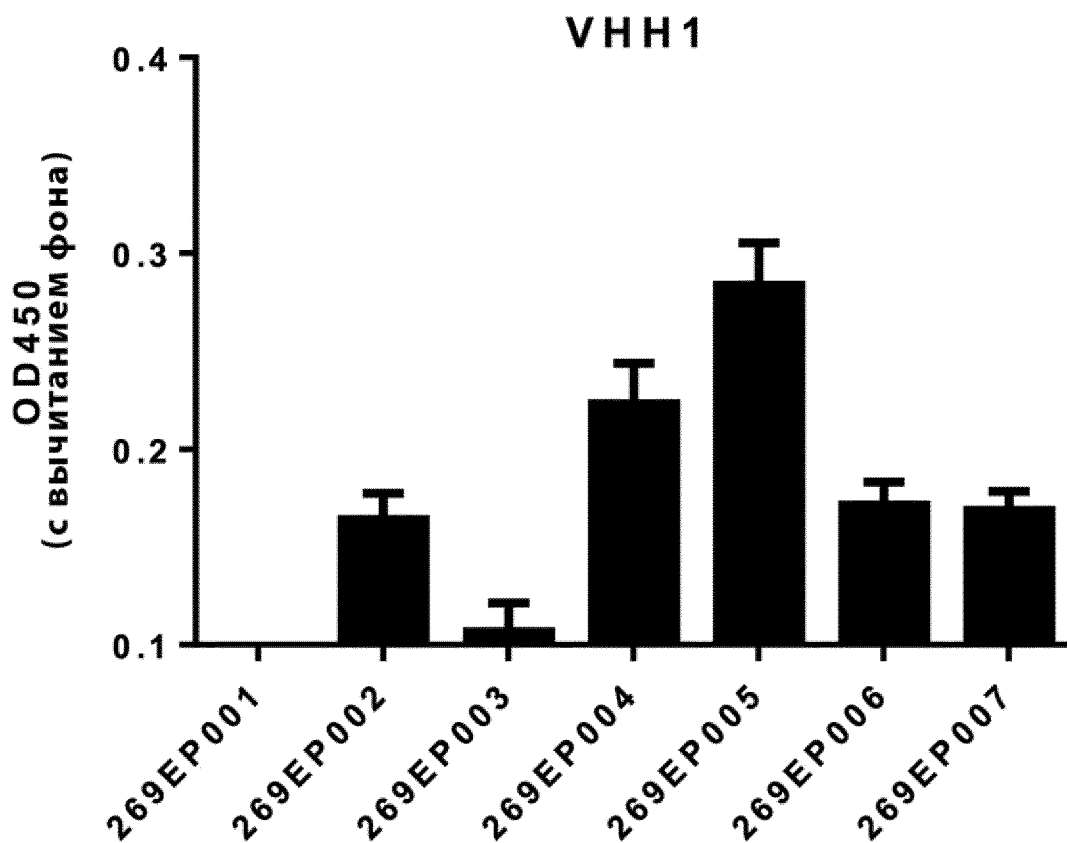


Фиг. 8А

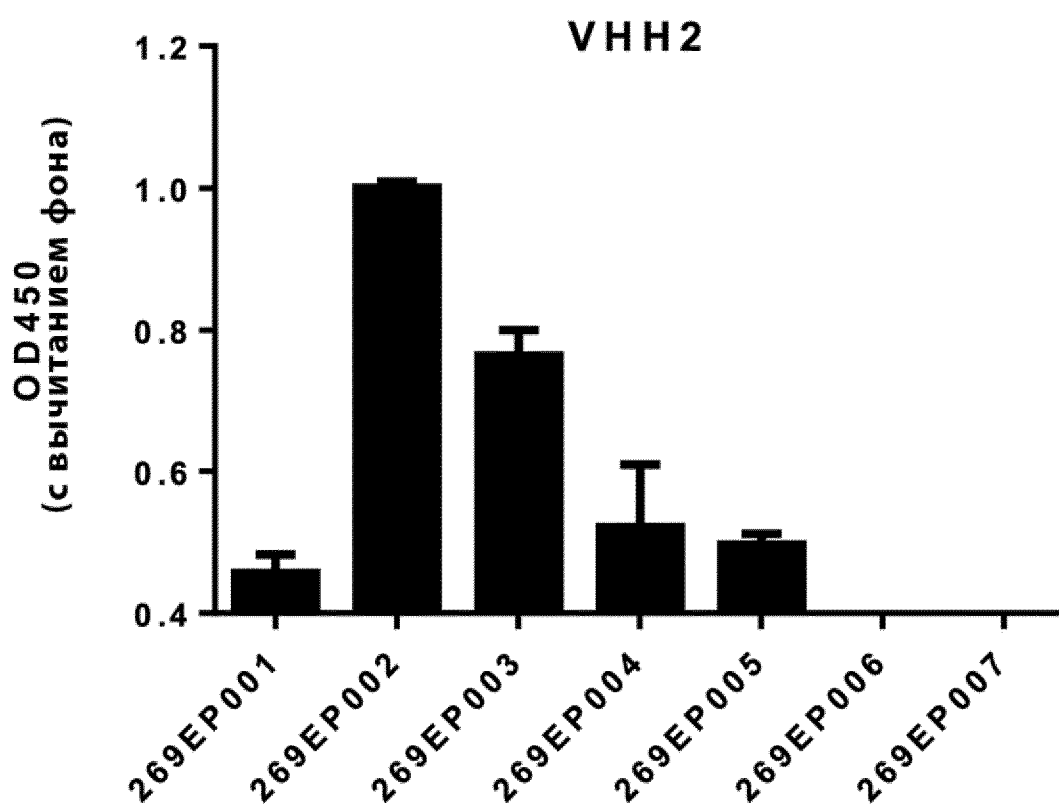
1 11 21 31 41 51
 (SEQ ID NO: 396) MLQMAGQCSQ NEYFDSLLHA CIPCQLRCSS NTPPLTCQRY CNASVTNSVK GTNA
└──────────────────┘ └──────────────────┘
Дисульфидные связи

Код	Положение	
269EP001	1-10	MLQMAGQ <u>C</u> SQ (SEQ ID NO: 389)
269EP002	8-21	<u>C</u> SQ NEYFDSLLHA <u>C</u> (SEQ ID NO: 390)
269EP003	11-23	NEYFDSLLHA <u>C</u> IP (SEQ ID NO: 391)
269EP004	20-30	A <u>C</u> IP <u>C</u> QLR <u>C</u> SS (SEQ ID NO: 392)
269EP005	24-42	<u>C</u> QLR <u>C</u> SS NTPPLT <u>C</u> QRY <u>C</u> N (SEQ ID NO: 393)
269EP006	36-43	T <u>C</u> QRY <u>C</u> NA (SEQ ID NO: 394)
269EP007	43-54	ASVTNSVK GTNA (SEQ ID NO: 395)

Фиг. 8B

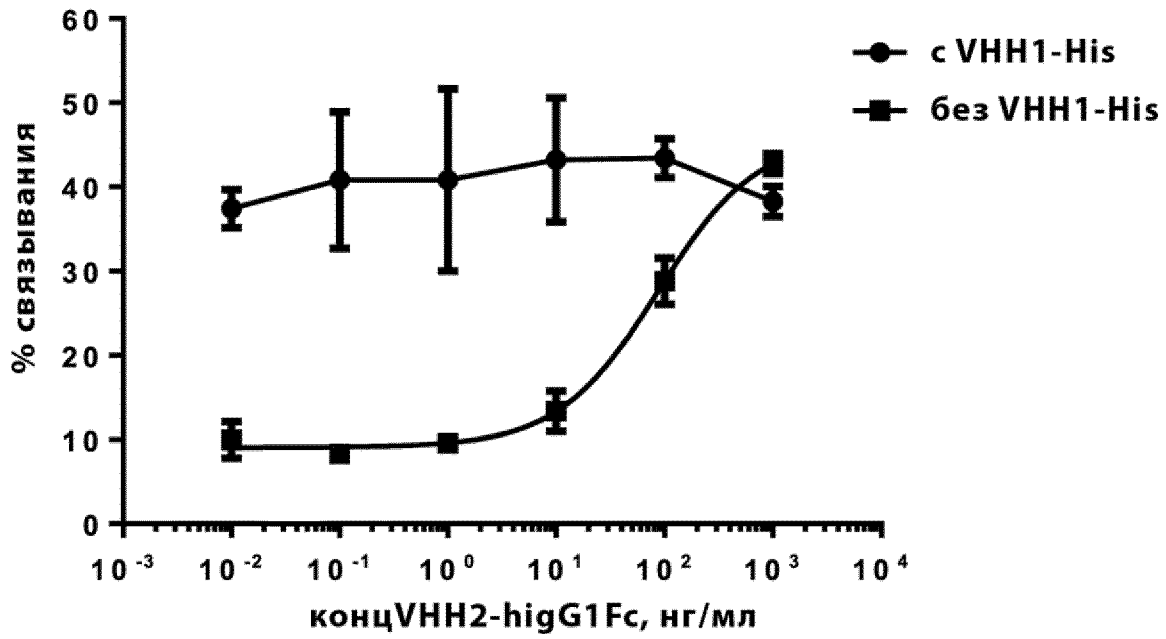


Фиг. 9А

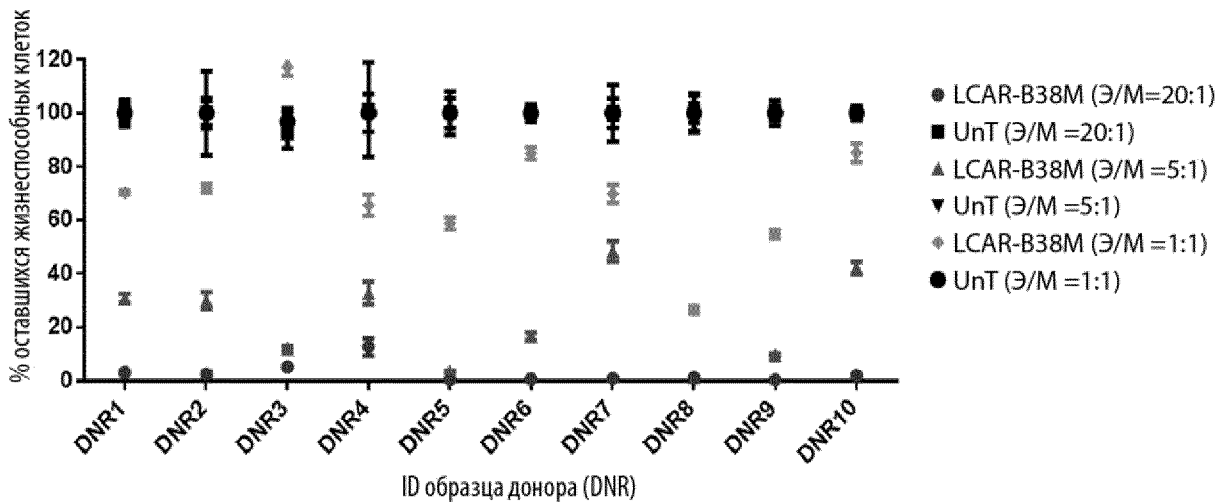


Фиг. 9В

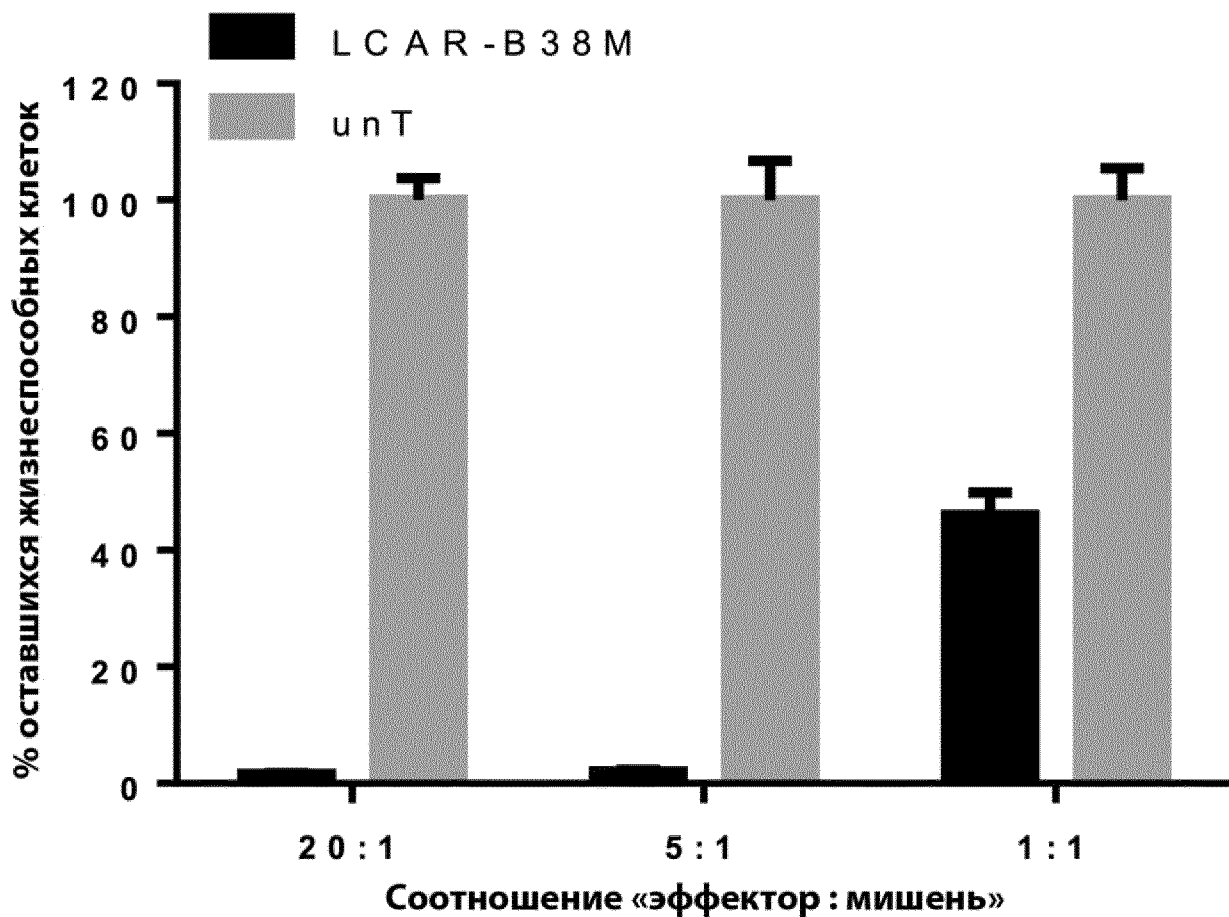
Связывание VHH на CHO-BCMA



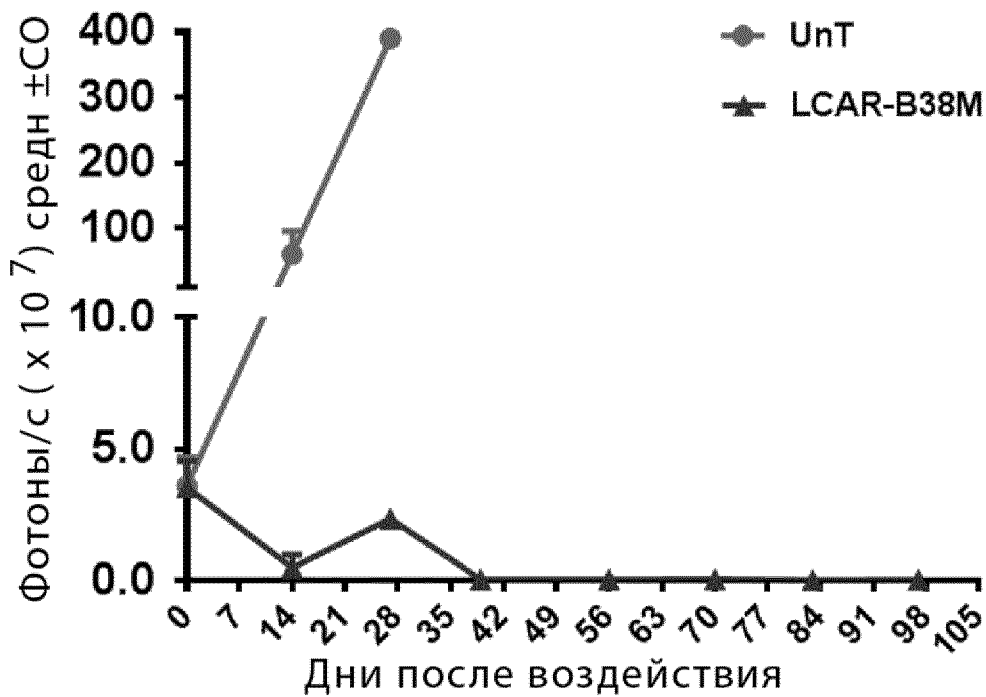
Фиг. 10



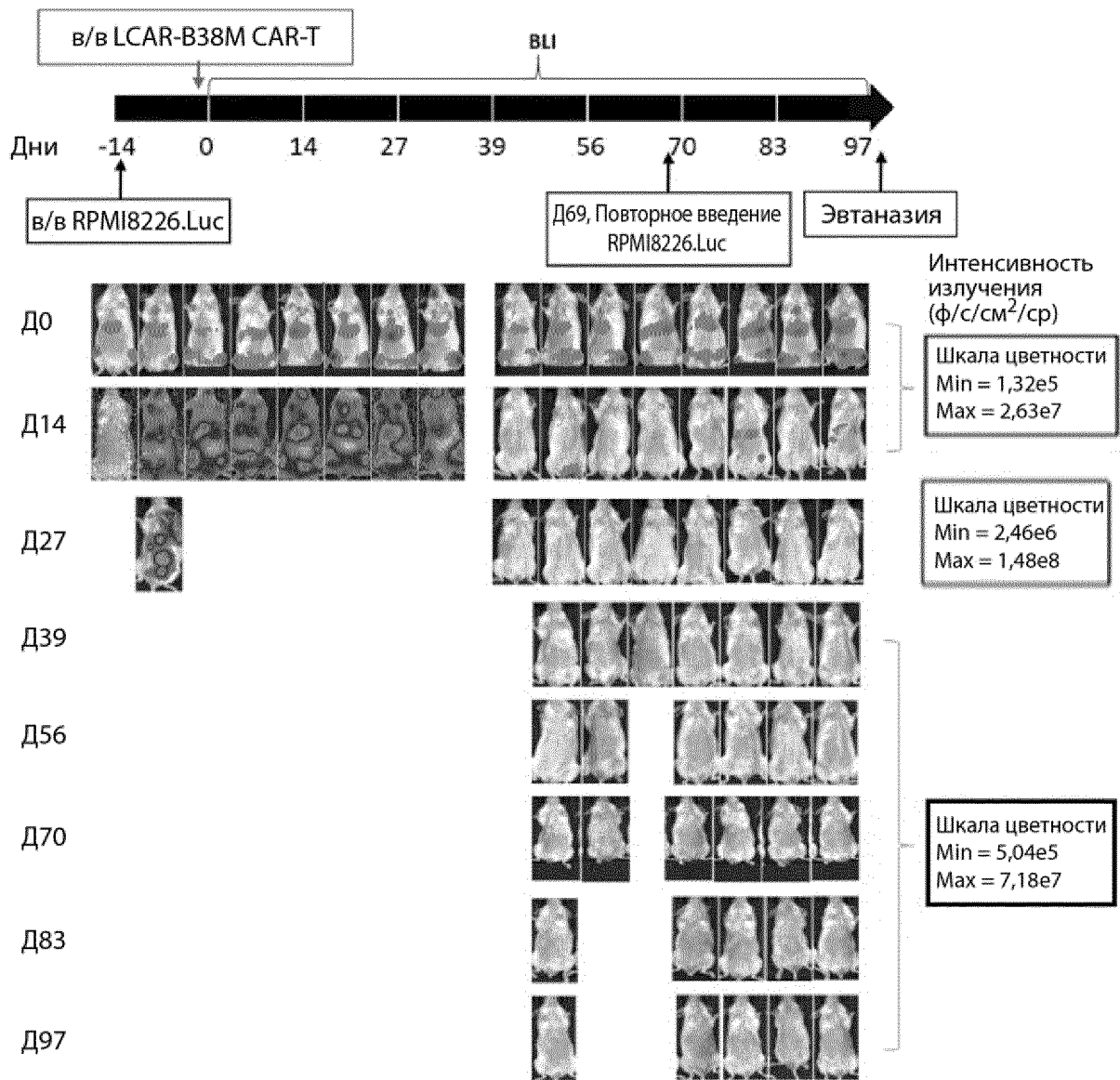
Фиг. 11



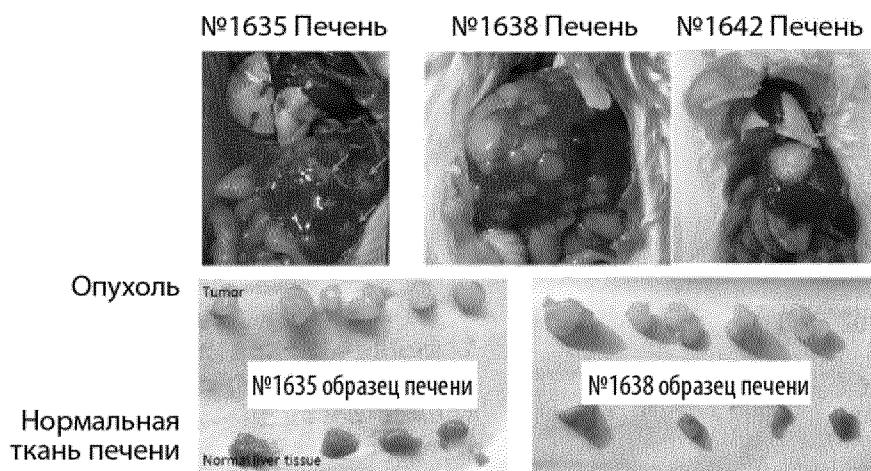
Фиг. 12А



Фиг. 12В

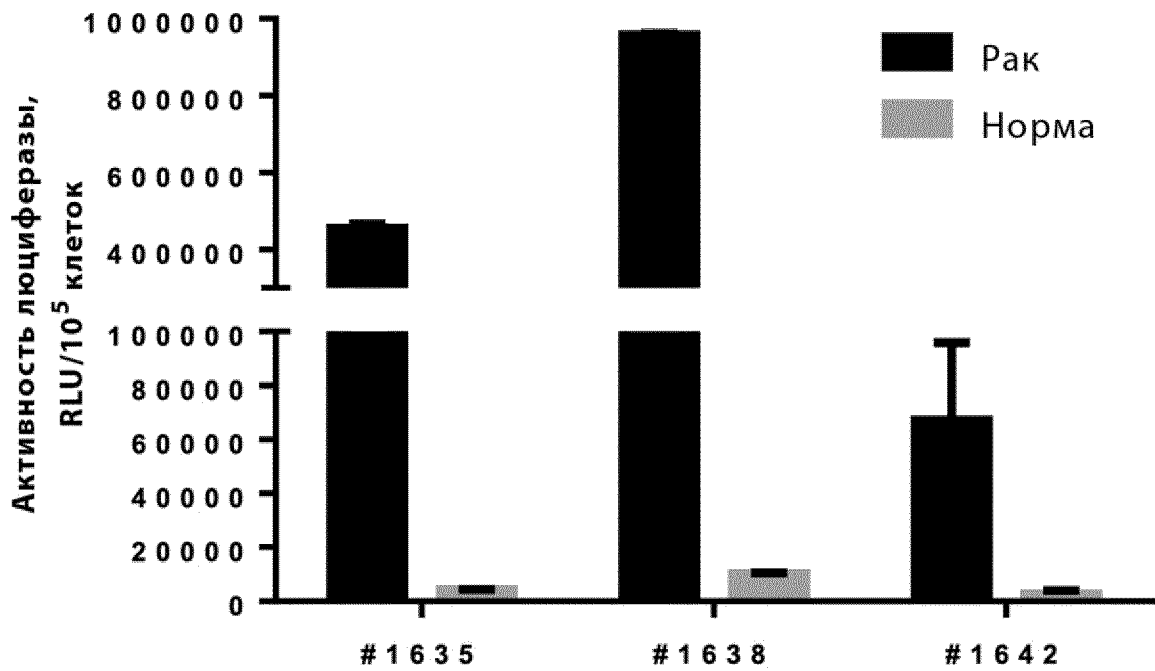


Фиг. 12С



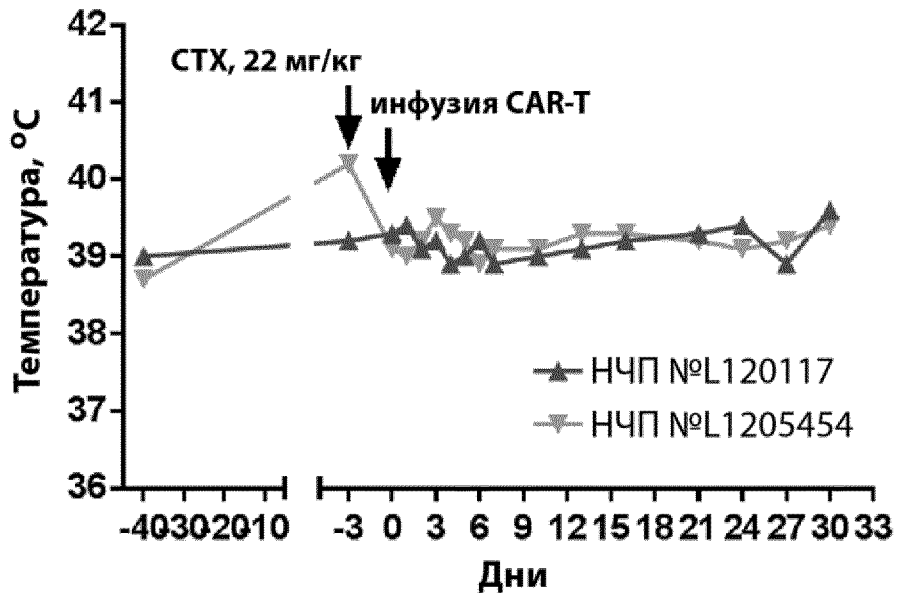
Фиг. 12D

активность люциферазы ex vivo
Печень мыши (unT)



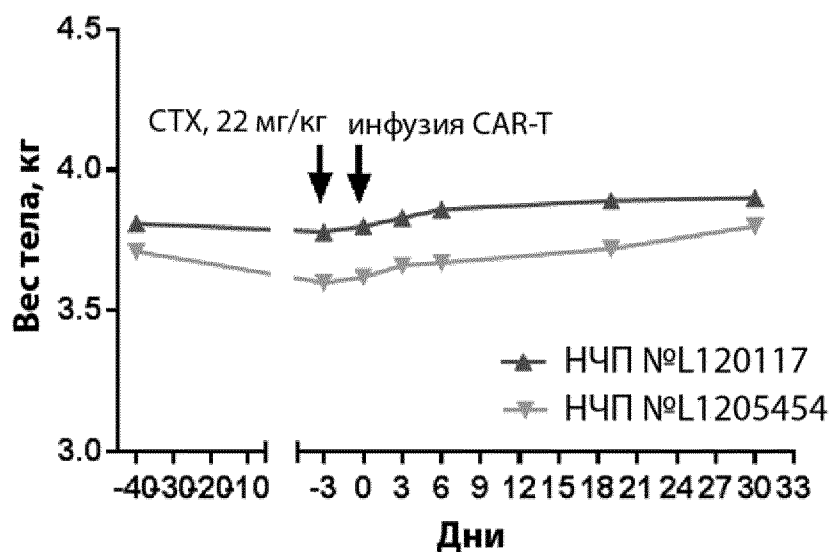
Фиг. 12Е

Мониторинг температуры тела НЧП



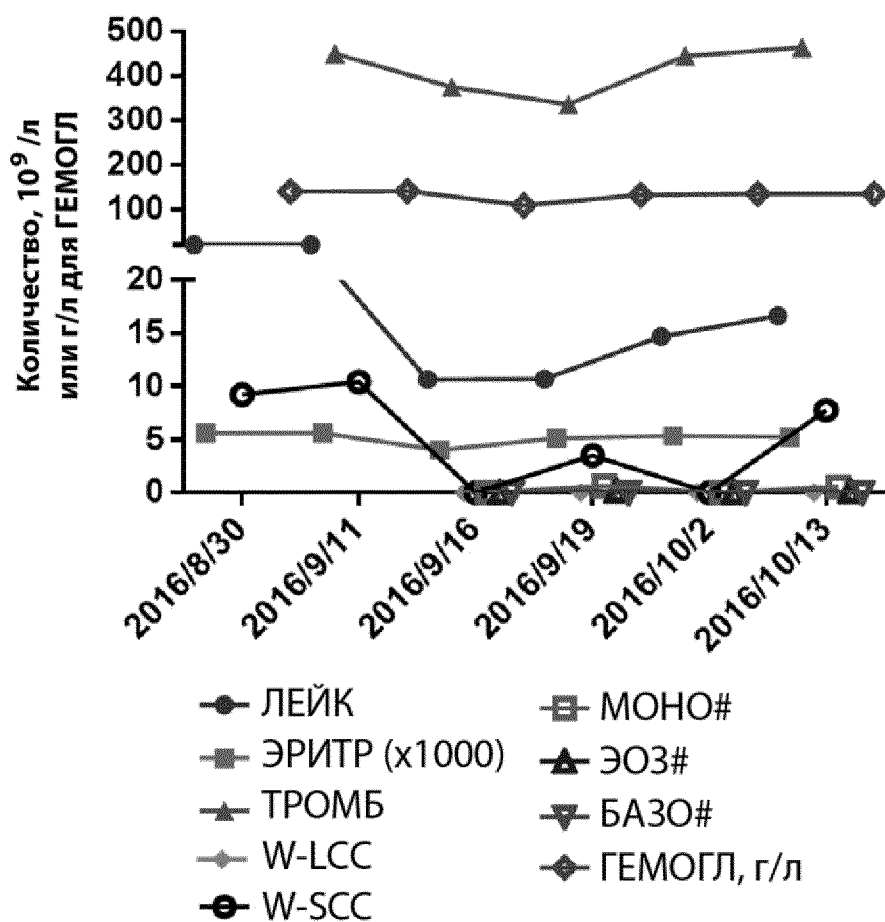
Фиг. 13А

Мониторинг исследования веса тела НЧП



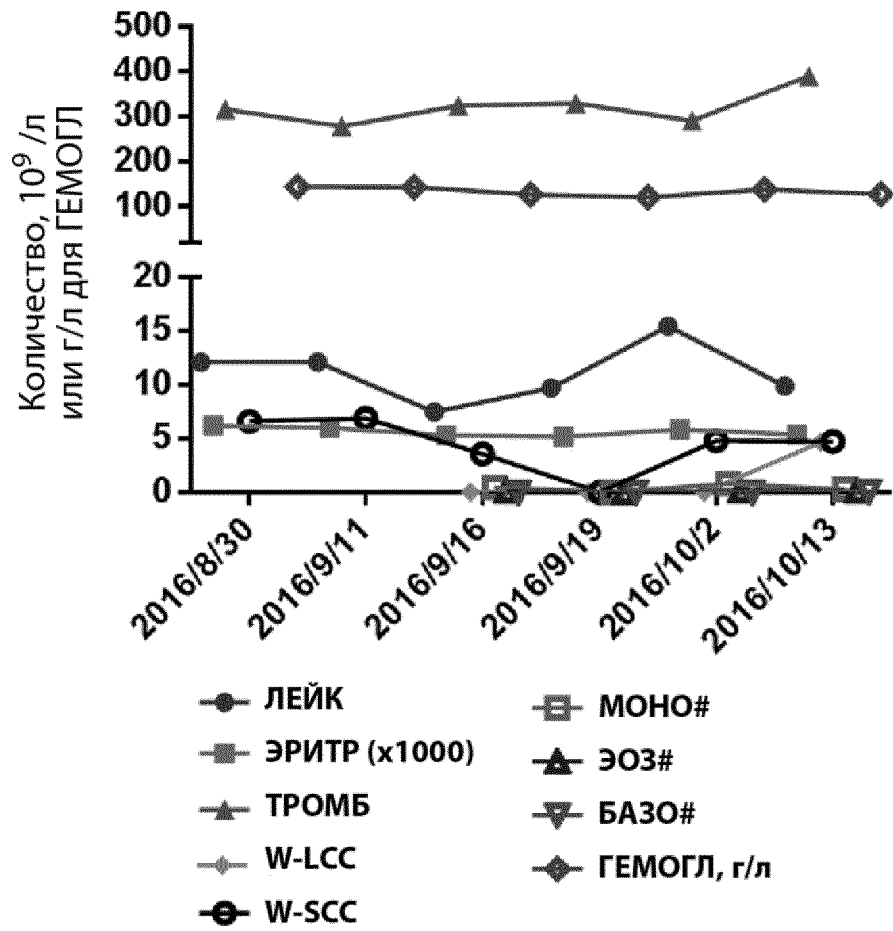
Фиг. 13В

НЧП №L120117



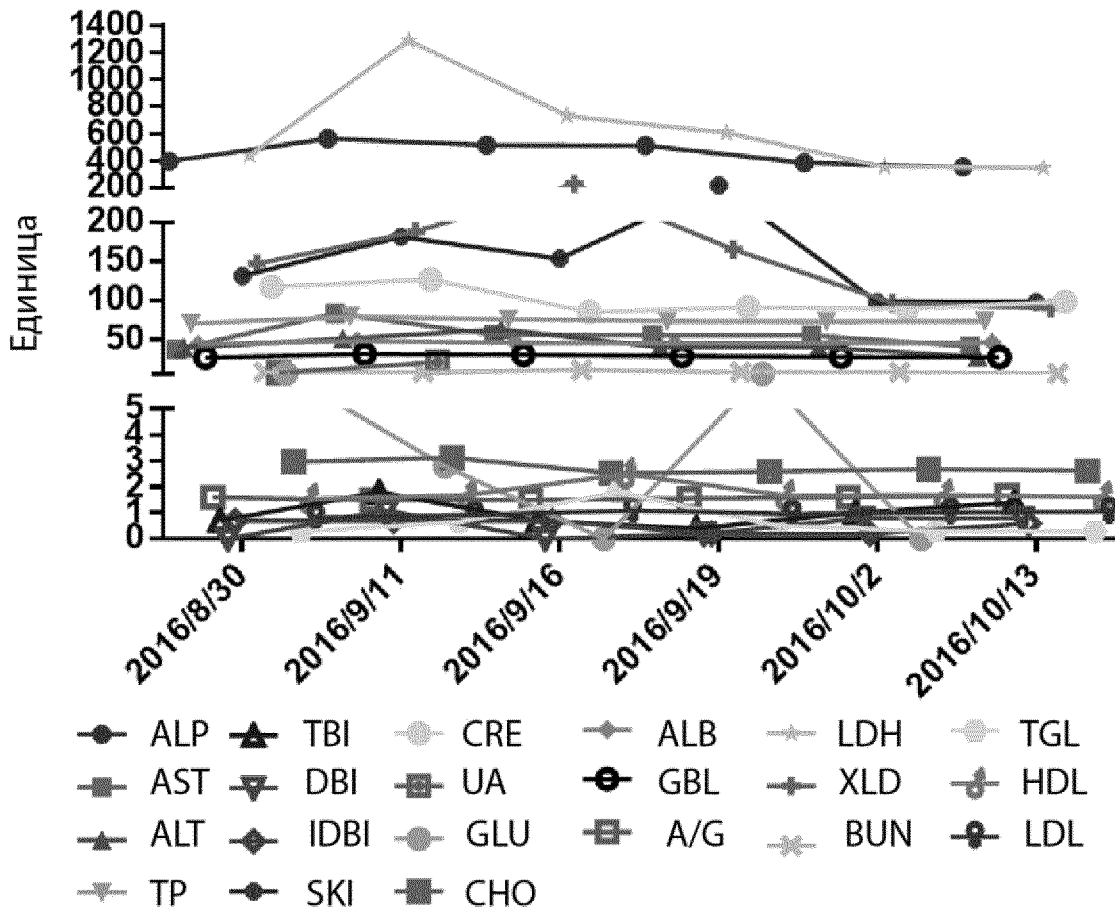
Фиг. 13С

НЧП №L120545



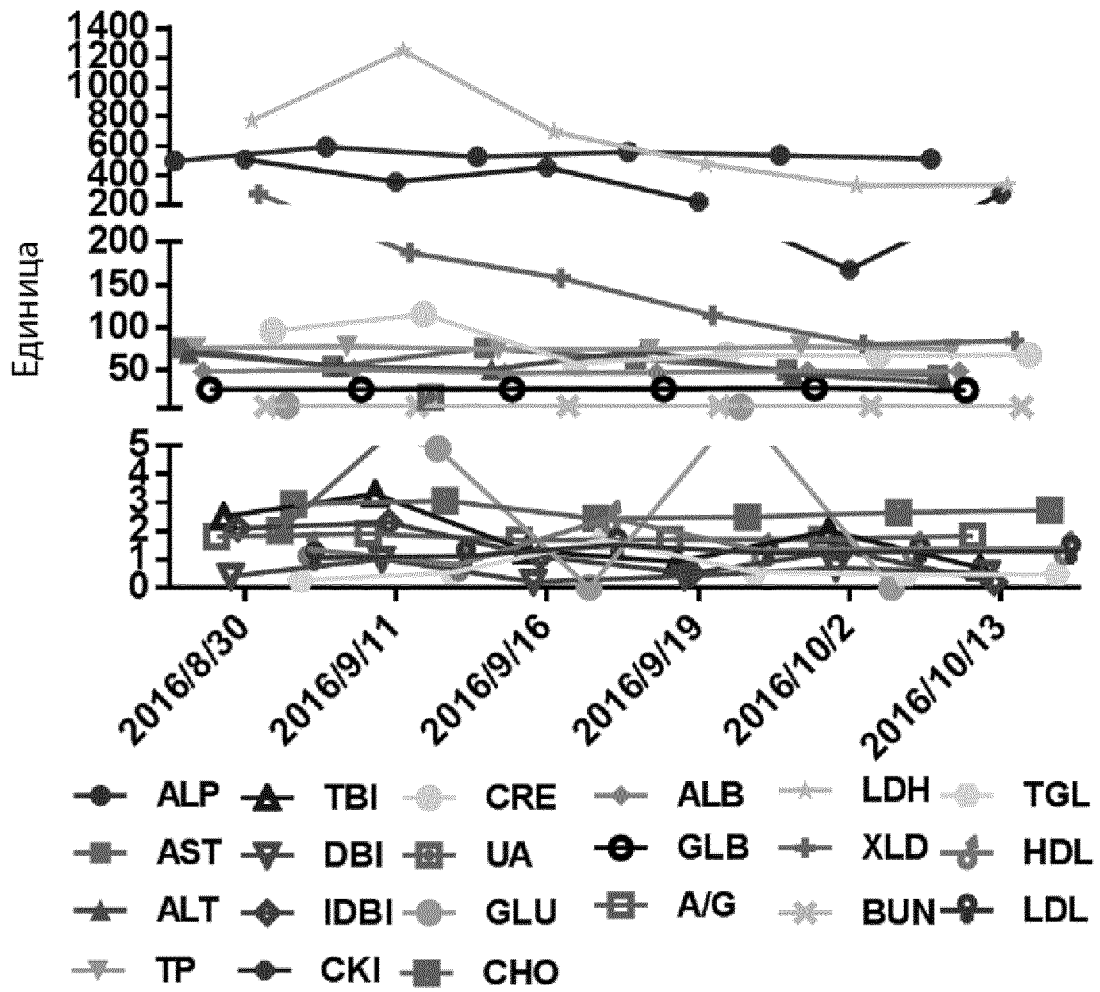
Фиг. 13D

НЧП №L120117

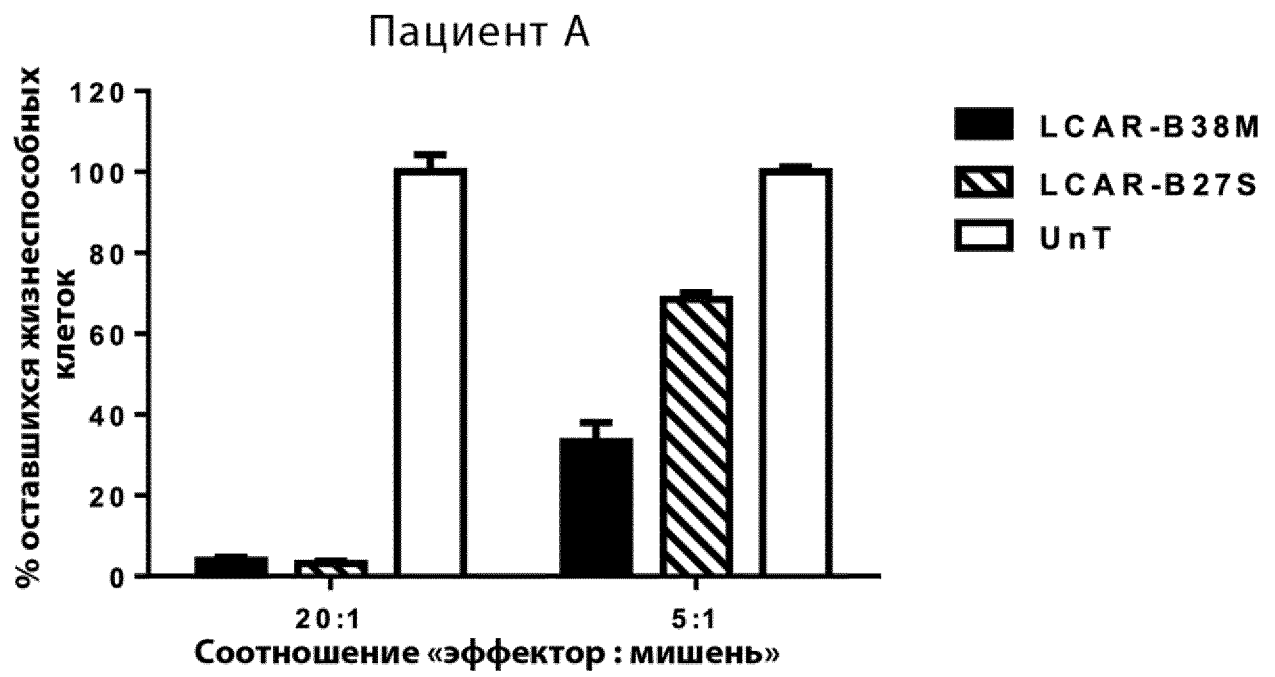


Фиг. 13Е

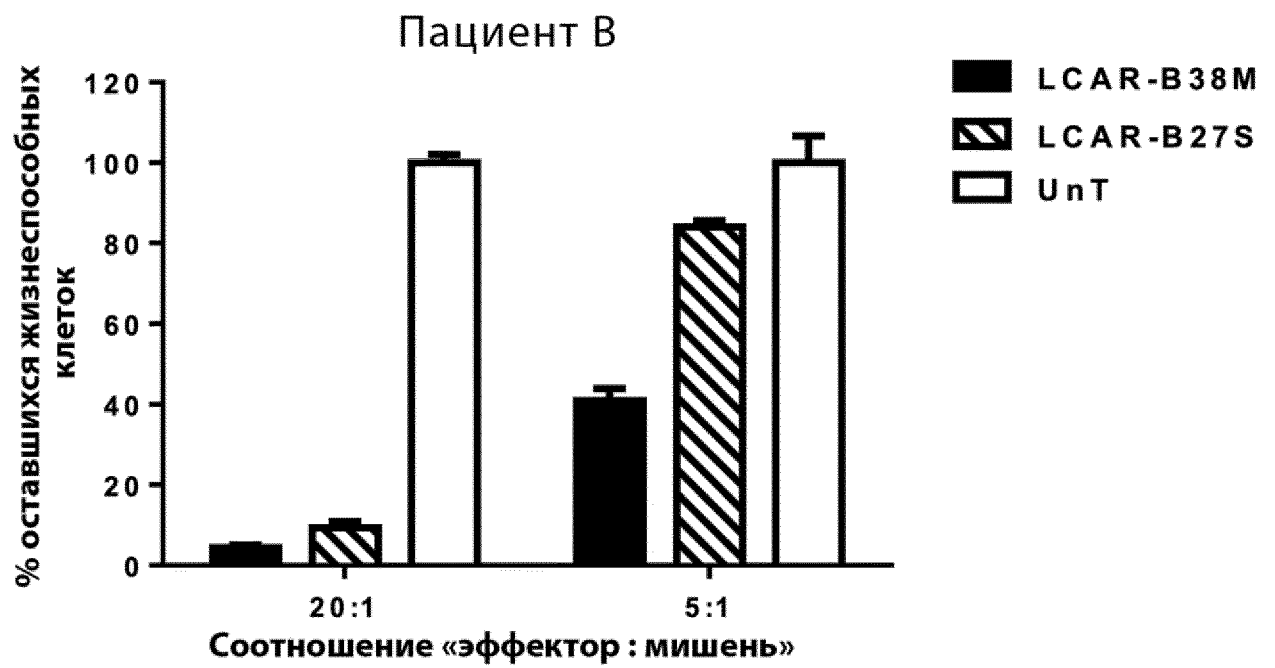
НЧП № L120545



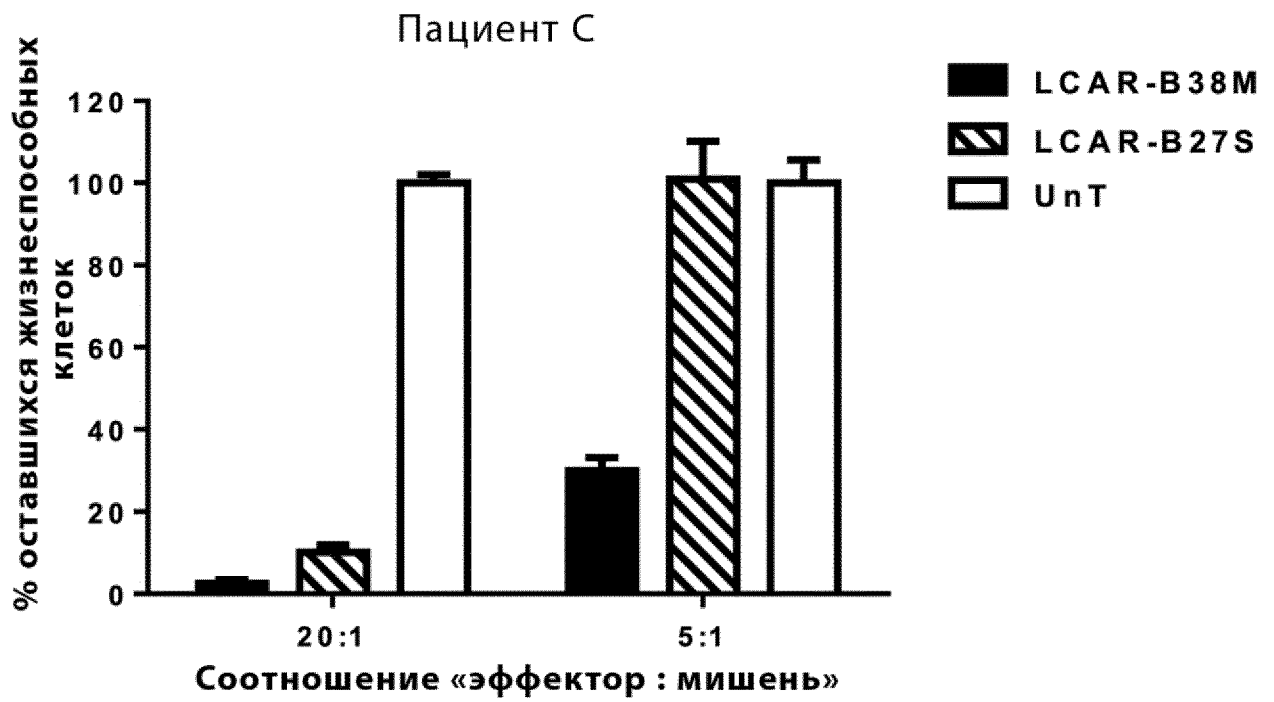
Фиг. 13F



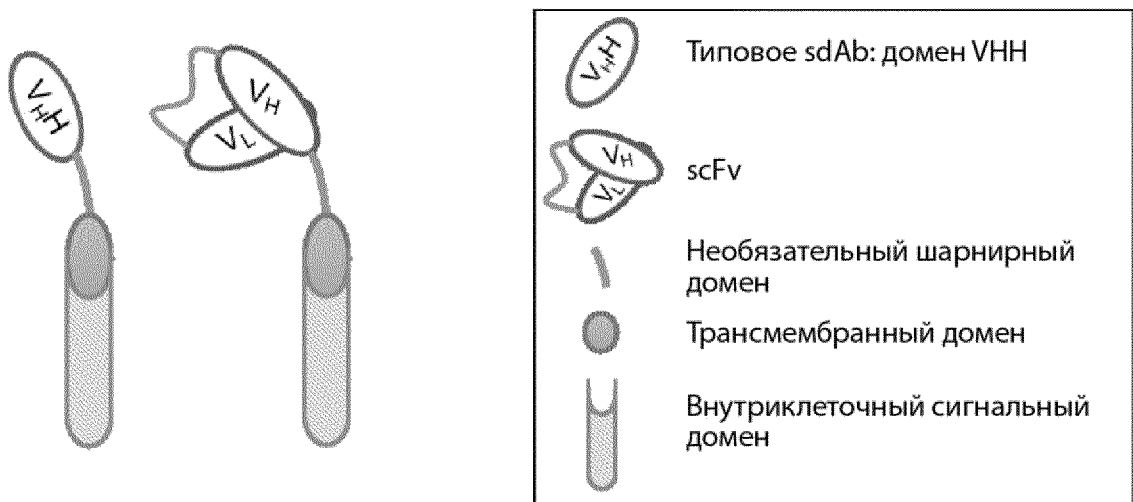
Фиг. 14А



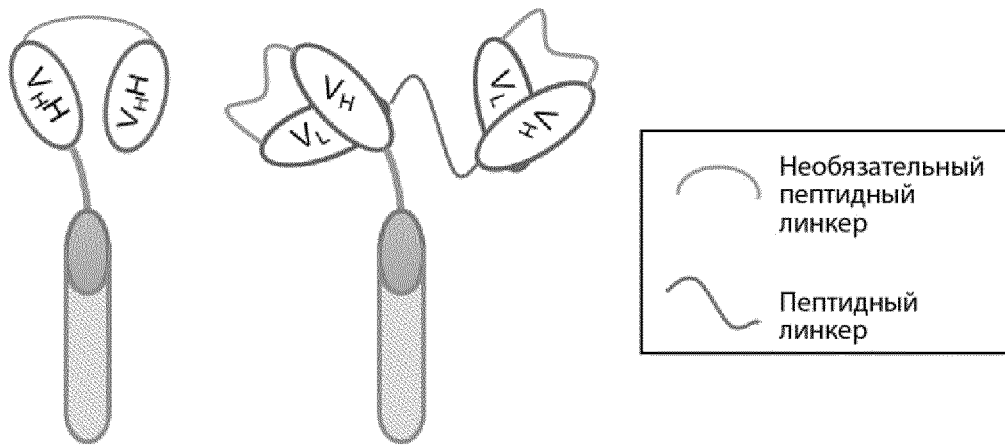
Фиг. 14В



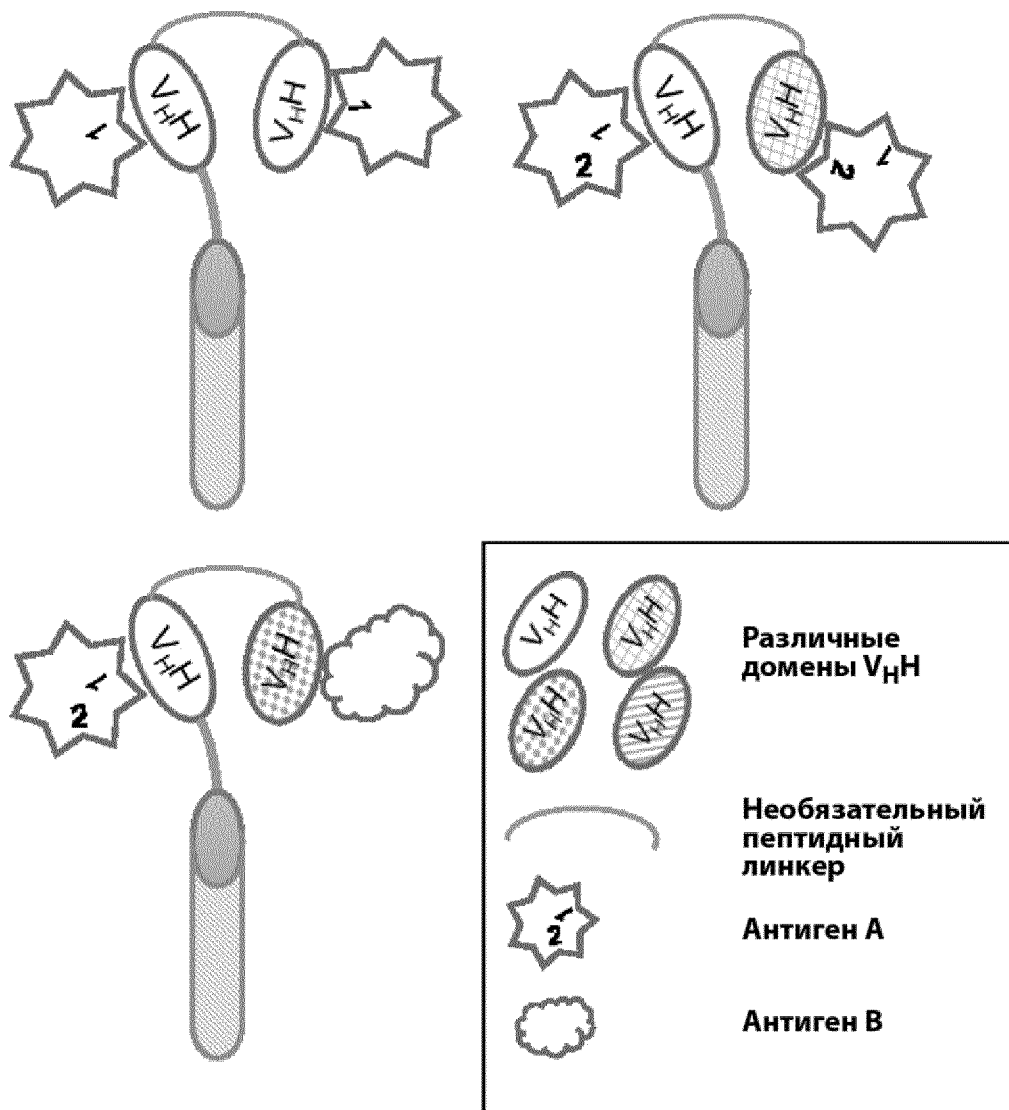
Фиг. 14С



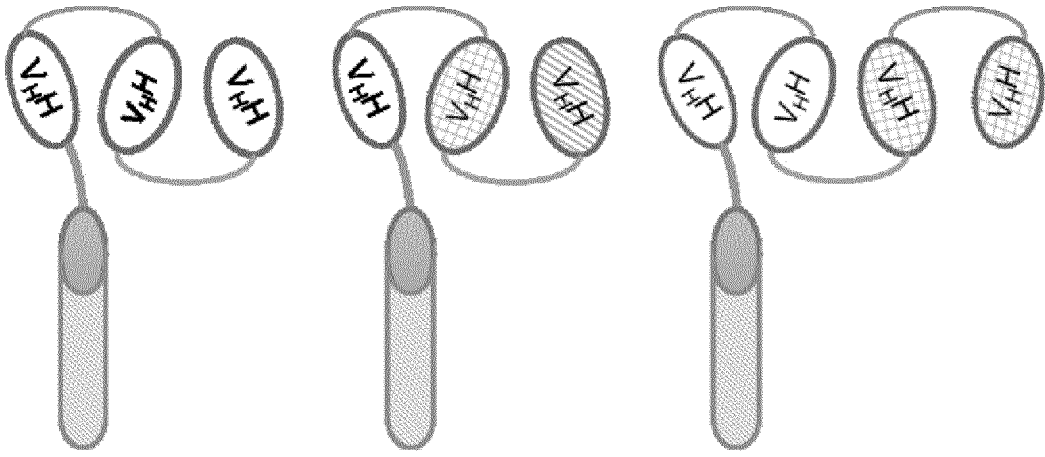
Фиг. 15А



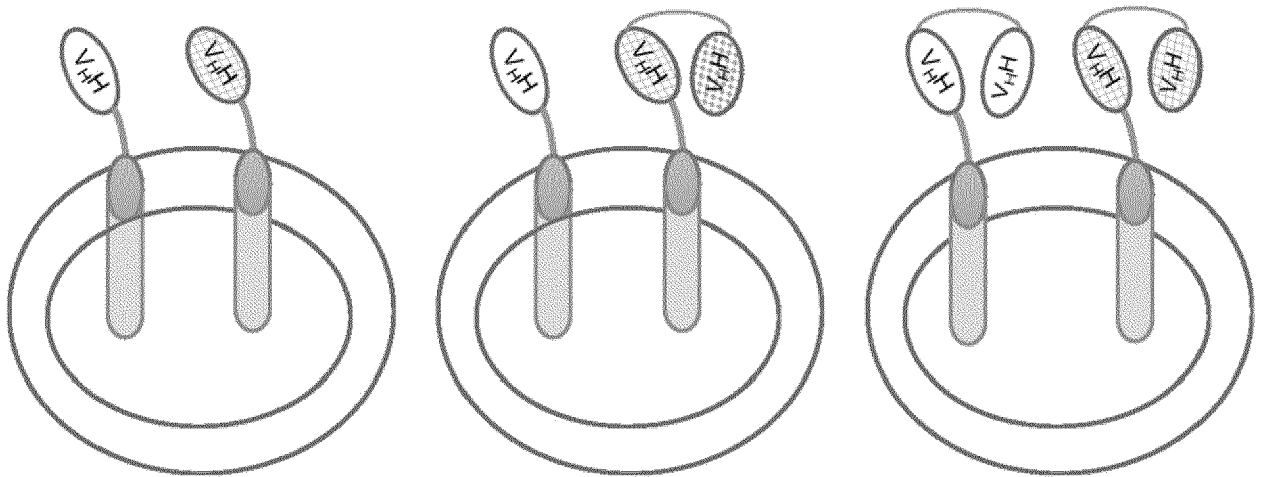
Фиг. 15В



Фиг. 15С



Фиг. 15D



Фиг. 15E