

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201990959 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.10

(22) Дата подачи заявки
2013.03.15

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА АНТИГЕН
СОЗРЕВАНИЯ В-КЛЕТОК

(31) 61/622,600

(32) 2012.04.11

(33) US

(62) 201491837; 2013.03.15

(71) Заявитель:

ДЗЕ ЮНАЙТЕД СТЕЙТС ОФ
АМЕРИКА, ЭЗ РЕПРЕЗЕНТЕД БАЙ
ДЗЕ СЕКРЕТАРИ, ДЕПАРТМЕНТ
ОФ ХЕЛС ЭНД ХЬЮМАН
СЕРВИСЕЗ (US)

(72) Изобретатель:

Кохендерфер Джеймс Нобл (US)

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к выделенной и очищенной нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей химерный рецептор антигена (CAR), направленный против антигена созреваения В-клеток (ВСМА). Данное изобретение также относится к клеткам-хозяевам, таким как Т-клетки или натуральные киллеры (НК-клетки), экспрессирующим CAR, и к способам разрушения клеток множественной миеломы.

A1

201990959

201990959

A1

ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА АНТИГЕН СОЗРЕВАНИЯ В-КЛЕТОК

Настоящее изобретение было создано при поддержке Правительства под
5 проектным номером ZIABC011417 Национальными Институтами
Здравоохранения, Национальным Институтом Онкологии. Правительство
обладает определенными правами на данное изобретение.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

10 [0000] Настоящая заявка выделена из заявки № 201491837 на выдачу
евразийского патента на изобретение, поданной 15.03.2013 г., с испрашиванием
приоритета по дате подачи заявки US 61/622,600, поданной 11.04.2012.

[0001] Данная патентная заявка претендует на приоритет
предварительной патентной заявки США № 61/622600, поданной 11 апреля 2012,
15 которая включена в данный документ во всей ее полноте посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Включенный в данный документ в полном объеме посредством
20 ссылки читаемый на компьютере список нуклеотидных/аминокислотных
последовательностей, представленный одновременно с данной заявкой и
определенный следующим образом: один файл размером 42589 байт ASCII
(Text) с названием "712361_ST25.TXT", созданный 14 марта 2013 г.

25 УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Множественная миелома (ММ) представляет собой
злокачественное заболевание, которое характеризуется накоплением
клональных плазматических клеток (см., например, Palumbo et al., New England J.
Med., 364(11): 1046-1060 (2011), и Lonial et al., Clinical Cancer Res., 17(6): 1264-
30 1277 (2011)). Современные подходы к лечению ММ часто вызывают ремиссию, но
почти все пациенты в конечном итоге страдают от рецидива и умирают (см.,
например, Lonial et al., выше, и Rajkumar, Nature Rev. Clinical Oncol., 8(8): 479-491
(2011)). Было показано, что аллогенная трансплантация гемопоэтических
стволовых клеток вызывает иммуно-опосредованное удаление клеток миеломы;
35 тем не менее, токсичность этого подхода является высокой, и некоторые
пациенты излечиваются (см., например, Lonial et al., выше, и Salit et al., Clin.
Lymphoma, Myeloma, and Leukemia, 11(3): 247-252 (2011)). В настоящее время не

существует клинически эффективных FDA-утвержденных способов лечения ММ моноклональными антителами или аутологичными Т-клетками (см., например, Richardson et al., *British J. Haematology*, 154(6): 745-754 (2011), и Yi, *Cancer Journal*, 15(6): 502-510 (2009)).

5 [0004] Адоптивный перенос Т-клеток, генетически модифицированных для распознавания связанных со злокачественностью антигенов, выглядит обещающим в качестве нового подхода к лечению рака (см., например, Morgan et al., *Science*, 314(5796): 126-129 (2006); Brenner et al., *Current Opinion in Immunology*, 22(2): 251-257 (2010); Rosenberg et al., *Nature Reviews Cancer*, 8(4):
10 299-308 (2008), Kershaw et al., *Nature Reviews Immunology*, 5(12): 928-940 (2005); и Pule et al., *Nature Medicine*, 14(11): 1264-1270 (2008)). Т-клетки могут быть генетически модифицированы для экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR, chimeric antigen receptor), которые являются гибридными белками, состоящими из фрагмента распознавания антигена и доменов Т-клеточной
15 активации (см., например, Kershaw et al., выше, Eshhar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(2): 720-724 (1993), и Sadelain et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 21(2): 215-223 (2009)).

[0005] Для злокачественных образований В-клеточных линий был достигнут значительный прогресс в разработке адоптивных Т-клеточных
20 подходов, которые используют анти-CD19-CAR (см., например, Jensen et al., *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 16: 1245-1256 (2010); Kochenderfer et al., *Blood*, 116(20): 4099-4102 (2010); Porter et al., *The New England Journal of Medicine*, 365(8): 725-733 (2011); Savoldo et al., *Journal of Clinical Investigation*, 121(5): 1822-1826 (2011), Cooper et al., *Blood*, 101(4): 1637-1644 (2003); Brentjens et al.,
25 *Nature Medicine*, 9(3): 279-286 (2003); и Kalos et al., *Science Translational Medicine*, 3(95): 95ra73 (2011)). Адоптивно перенесенные Т-клетки, трансдуцированные анти-CD19-CAR, вылечили лейкемию и лимфому у мышей (см., например, Cheadle et al., *Journal of Immunology*, 184(4): 1885-1896 (2010); Brentjens et al., *Clinical Cancer Research*, 13(18 Pt 1): 5426-5435 (2007); и
30 Kochenderfer et al., *Blood*, 116(19): 3875-3886 (2010)). В ранних клинических испытаниях адоптивно перенесенные Т-клетки, трансдуцированные анти-CD19-CAR, удаляли нормальные и злокачественные В-клетки у пациентов с лейкемией и лимфомой (см., например, Kochenderfer et al., *Blood*, 116(20): 4099-4102 (2010); Porter et al., *supra*, Brentjens et al., *Blood*, 118(18): 4817-4828 (2011); и Kochenderfer
35 et al., *Blood*, December 8, 2011 (электронная публикация перед печатью (2012)). Тем не менее, CD19 только в редких случаях экспрессируется на злокачественных плазматических клетках множественной миеломы (см.,

например, Gupta et al., Amer. J. Clin. Pathology, 132(5): 728-732 (2009); и Lin et al., Amer. J. Clin. Pathology, 121(4): 482-488 (2004)).

[0006] Таким образом, существует потребность в композициях, которые могут быть использованы в способах лечения множественной миеломы. Это изобретение предусматривает такие композиции и способы.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Данное изобретение относится к выделенной или очищенной нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей химерный рецептор антигена (CAR), где CAR включает фрагмент распознавания антигена и фрагмент Т-клеточной активации, и где фрагмент распознавания антигена направлен против антигена созревания В-клеток (BCMA).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0008] Фиг. 1А и 1В представляют собой графики, на которых изображены экспериментальные данные, иллюстрирующие характер экспрессии BCMA в различных типах человеческих клеток, определенный с помощью количественной ПЦР. Результаты выражены как число копий кДНК BCMA на 10^5 копий кДНК актина.

[0009] Фиг. 2А-2L представляют собой графики, на которых изображены экспериментальные данные, иллюстрирующие, что экспрессия BCMA на клеточной поверхности была обнаружена на нескольких клеточных линиях миеломы, но не на других типах клеток, как описано в примере 1. Во всех графиках сплошная линия представляет окрашивание анти-BCMA-антителами, а пунктирная линия представляет окрашивание контрольными антителами, подходящими по изотипу. На всех графиках клетки гейтировали по живым клеткам.

[0010] Фиг. 3А представляет собой схему, на которой изображена нуклеиновокислотная конструкция, кодирующая анти-BCMA-CAR. В направлении с N-конца к С-концу анти-BCMA-CAR включает анти-BCMA scFv, шарнирную и трансмембранную области молекулы CD8 α , цитоплазматическую часть молекулы CD28 и цитоплазматическую часть молекулы CD3 ζ .

[0011] Фиг. 3В-3D представляют собой графики, на которых изображены экспериментальные данные, иллюстрирующие, что анти-bcma1-CAR, анти-bcma2-CAR и SP6-CAR (описаны в примере 2) экспрессируются на поверхности Т-клеток. Минимальное анти-Fab-окрашивание произошло на нетрансдуцированных (UT, untransduced) клетках. На всех графиках клетки

гейтировали по CD3⁺-лимфоцитам. Цифры на графиках являются процентами клеток в каждом квадранте.

[0012] Фиг. 4A-4C представляют собой графики, на которых изображены экспериментальные данные, иллюстрирующие, что Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA-CAR, вызывают дегрануляцию Т-клеток BCMA-специфическим образом, как описано в примере 3. На графиках клетки гейтировали по живым CD3⁺-лимфоцитам. Цифры на графиках являются процентами клеток в каждом квадранте.

[0013] Фиг. 5A-5D представляют собой графики, на которых изображены экспериментальные данные, иллюстрирующие, что Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA-CAR, вызывают дегрануляцию Т-клеток BCMA-специфическим образом, как описано в примере 3. На графиках клетки гейтировали по живым CD3⁺-лимфоцитам. Цифры на графиках являются процентами клеток в каждом квадранте.

[0014] Фиг. 6A-6C представляют собой графики, на которых изображены экспериментальные данные, иллюстрирующие, что Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA-CAR, продуцируют цитокины IFN γ , IL-2 и TNF BCMA-специфическим образом, как описано в примере 3. На графиках клетки гейтировали по живым CD3⁺-лимфоцитам. Цифры на графиках являются процентами клеток в каждом квадранте.

[0015] Фиг. 7A представляет собой график, который изображает экспериментальные данные, иллюстрирующие, что Т-клетки, экспрессирующие анти-bcma2-CAR, специфически пролиферируют в ответ на BCMA. Фиг. 6B представляет собой график, который изображает экспериментальные данные, иллюстрирующие, что Т-клетки, экспрессирующие SP6-CAR, не пролиферируют специфически в ответ на BCMA.

[0016] Фиг. 7C и 7D представляют собой графики, на которых изображены экспериментальные данные, иллюстрирующие, что Т-клетки от донора А, экспрессирующие анти-bcma2-CAR, специфически убивают клеточные линии множественной миеломы H929 (фиг. 6C) и RPMI8226 (фиг. 6D) в четырехчасовом анализе цитотоксичности при различных соотношениях эффектор: клетка-мишень. Т-клетки, трансдуцированные отрицательным контролем SP6-CAR, индуцируют гораздо более низкие уровни цитотоксичности во всех соотношениях эффектор: мишень. Для всех соотношений эффектор: мишень была определена цитотоксичность в двух повторах, и результаты представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего.

[0017] Фиг. 8А представляет собой график, который изображает экспериментальные данные, иллюстрирующие, что ВСМА экспрессируется на поверхности первичных клеток множественной миеломы костного мозга от пациента с миеломой 3, как описано в примере 5. На графике клетки гейтировали по CD38^{высокий} CD56⁺-плазматическим клеткам, которые составляют до 40% клеток костного мозга.

[0018] Фиг. 8В представляет собой график, на котором изображены экспериментальные данные, иллюстрирующие, что аллогенные Т-клетки от донора С, трансдуцированные анти-*bcma*2-CAR, продуцируют IFN γ после совместного культивирования с необработанными клетками костного мозга от пациента с миеломой 3, как описано в примере 5. Фиг. 7В также иллюстрирует, что Т-клетки от одного и того же аллогенного донора, экспрессирующие анти-*bcma*2-CAR, продуцируют гораздо меньше IFN γ , когда они культивированы с мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) от пациента с миеломой 3. Кроме того, Т-клетки от донора С, экспрессирующие SP6-CAR, специфически не распознают костный мозг от пациента с миеломой 3.

[0019] Фиг. 8С представляет собой график, который изображает экспериментальные данные, иллюстрирующие, что плазмоцитома, резецированная у пациента с миеломой 1, состоит на 93% из плазматических клеток, и эти первичные плазматические клетки экспрессируют ВСМА, что показано с помощью проточной цитометрии на ВСМА (сплошная линия) и путем окрашивания изотипическим контролем (пунктирная линия). На всех графиках клетки гейтировали по плазматическим клеткам.

[0020] Фиг. 8D представляет собой график, который изображает экспериментальные данные, иллюстрирующие, что Т-клетки от пациента с миеломой 1, экспрессирующие анти-*bcma*2-CAR, продуцируют IFN γ специфически в ответ на аутологичные клетки плазмоцитомы.

[0021] Фиг. 8Е представляет собой график, показывающий экспериментальные данные, иллюстрирующие, что Т-клетки от пациента с миеломой 1, экспрессирующие анти-*bcma*2-CAR, специфически убивают аутологичные клетки плазмоцитомы при низком соотношении эффектор: мишень. Напротив, Т-клетки от пациента с миеломой 1, экспрессирующие SP6-CAR, демонстрируют низкие уровни цитотоксичности против аутологичных клеток плазмоцитомы. Для всех соотношений эффектор: мишень была определена цитотоксичность в двух повторах, и результаты представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего.

[0022] Фиг. 9А представляет собой график, который изображает экспериментальные данные, иллюстрирующие, что Т-клетки, трансдуцированные анти-вста2-CAR, могут разрушать верифицированные опухоли множественной миеломы у мышей. Фиг. 9В представляет собой график, который изображает выживание мышей с опухолями, получавших Т-клетки, экспрессирующие анти-вста2-CAR, по сравнению с контрольной группой.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0023] Данное изобретение относится к выделенной или очищенной нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей химерный рецептор антигена (CAR), где CAR содержит фрагмент распознавания антигена и фрагмент Т-клеточной активации. Химерный рецептор антигена (CAR) является искусственно созданным гибридным белком или полипептидом, содержащим антигенсвязывающий домен антитела (например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv)), связанный с Т-клеточным сигналингом или доменами Т-клеточной активации. CAR имеют возможность перенаправлять Т-клеточную специфичность и реактивность на выбранную мишень МНС-неограниченным образом, используя антигенсвязывающие свойства моноклональных антител. МНС-неограниченное распознавание антигена дает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антиген независимо от процессинга антигена, таким образом минуя главный механизм избегания опухоли. Более того, при экспрессии в Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с альфа- и бета-цепями эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR).

[0024] Понятие "нуклеиновокислотной последовательности" охватывает полимеры ДНК или РНК, т.е. полинуклеотиды, которые могут быть одноцепочечными или двуцепочечными, и которые могут содержать неприродные или измененные нуклеотиды. Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид", используемые в данном описании, относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, рибонуклеотидов (РНК) или дезоксирибонуклеотидов (ДНК). Эти термины относятся к первичной структуре молекулы, и, таким образом, включают дву- и одноцепочечную ДНК, а также дву- и одноцепочечную РНК. Термины включают, в качестве эквивалентов, аналоги РНК или ДНК, изготовленные из нуклеотидных аналогов и модифицированных полинуклеотидов, таких как, но не ограничиваясь ими, метилированные и/или кэппированные полинуклеотиды.

[0025] Под "выделенной" подразумевается удаление нуклеиновой кислоты из ее природной среды. Под "очищенной" подразумевается, что данная

нуклеиновая кислота, была ли она выделена из природной среды (в том числе геномная ДНК и мРНК) или синтезирована (в том числе кДНК) и/или амплифицирована в лабораторных условиях, имеет повышенную чистоту, где "чистота" является относительным термином, а не "абсолютной чистотой". Тем не менее, следует понимать, что нуклеиновые кислоты и белки могут быть собраны в состав с разбавителями или адъювантами и по-прежнему для практических целей быть выделены. Например, нуклеиновые кислоты, как правило, смешивают с приемлемым носителем или разбавителем, когда используют их для введения в клетки.

10 [0026] Нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению кодирует CAR, который содержит фрагмент распознавания антигена, направленный против антигена созревания В-клеток (BCMA, также известного как CD269). BCMA является членом суперсемейства рецептора фактора некроза опухоли (см., например, Thompson et al., J. Exp. Medicine, 192(1): 129-135 (2000), и Mackay et al., Annu. Rev. Immunol., 21: 231-264 (2003)). BCMA связывает фактор В-клеточной активации (BAFF) и лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL) (см., например, Mackay et al., см. выше, и Kalled et al., Immunological Reviews, 204: 43-54 (2005)). Сообщалось, что среди доброкачественных клеток BCMA экспрессируется в основном в плазматических клетках и субпопуляции зрелых В-клеток (см., например, Laabi et al., EMBO J., 11(11): 3897-3904 (1992); Laabi et al., Nucleic Acids Res., 22(7): 1147-1154 (1994); Kalled et al., выше; O'Connor et al., J. Exp. Medicine, 199(1): 91-97 (2004); и Ng et al., J. Immunol., 173(2): 807-817 (2004)). Мыши, дефицитные по BCMA, здоровы и имеют нормальное число В-клеток, но выживание долгоживущих плазматических клеток нарушается (см., например, O'Connor et al., выше; Xu et al., Mol. Cell. Biol., 21(12): 4067-4074 (2001); и Schiemann et al., Science, 293(5537): 2111-2114 (2001)). РНК BCMA была обнаружена повсеместно в клетках множественной миеломы, а белок BCMA был обнаружен на поверхности плазматических клеток от пациентов с множественной миеломой несколькими исследователями (см., например, Novak et al., Blood, 103(2): 689-694 (2004); Neri et al., Clinical Cancer Research, 13(19): 5903-5909 (2007); Bellucci et al., Blood, 105(10): 3945-3950 (2005); и Moreaux et al., Blood, 103(8): 3148-3157 (2004)).

35 [0027] Нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению кодирует CAR, который содержит фрагмент распознавания антигена, содержащий моноклональное антитело, направленное против BCMA, или его антигенсвязывающую часть. Термин "моноклональные антитела", используемый в данном документе, относится к антителам, которые продуцируются одним

клоном В-клеток и связываются с одним и тем же эпитопом. Напротив, "поликлональные антитела" относятся к популяции антител, которые продуцируются различными В-клетками и связываются с различными эпитопами одного и того же антигена. Фрагмент распознавания антигена в CAR, кодируемый нуклеиновокислотной последовательностью согласно изобретению, может быть целым антителом или фрагментом антитела. Целое антитело, как правило, состоит из четырех полипептидов: двух идентичных копий полипептида тяжелой (H) цепи и двух идентичных копий полипептида легкой (L) цепи. Каждая из тяжелых цепей содержит одну N-концевую переменную (VH) область и три C-концевых константных (CH1, CH2 и CH3) области, а каждая легкая цепь содержит одну N-концевую переменную (VL) область и одну C-концевую константную (CL) область. Переменные области каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют сайт связывания антигена с антителом. Области VH и VL имеют одинаковую общую структуру, при этом каждая область содержит четыре каркасные области, последовательности которых относительно консервативны. Каркасные области соединены тремя определяющими комплементарность областями (CDR). Три CDR, известные как CDR1, CDR2 и CDR3, образуют "гиперпеременную область" антитела, которая отвечает за связывание антигена.

[0028] Термины "фрагмент антитела", "функциональный фрагмент антитела" и "антигенсвязывающий фрагмент" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения одного или более чем одного фрагмента или части антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (см., в целом, Holliger et al., Nat. Biotech., 23(9): 1126-1129 (2005)). Фрагмент распознавания антигена в CAR, кодируемый нуклеиновокислотной последовательностью согласно изобретению, может содержать любой фрагмент ВСМА-связывающего антитела. Желательно, чтобы фрагмент антитела содержал, например, одну или более чем одну CDR, переменную область (или ее части), константную область (или ее части) или их комбинации. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваясь ими, (i) Fab-фрагмент, который представляет собой моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, который представляет собой бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fv-фрагмент, состоящий из VL- и VH-доменов одного плеча антитела; (iv) одноцепочечный Fv (scFv), который представляет собой моновалентную молекулу, состоящую из двух доменов Fv-фрагмента (т.е. VL и VH), соединенных синтетическим линкером, который позволяет синтезировать

два домена в виде одной полипептидной цепи (см., например, Bird et al., Science, 242: 423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988); и Osbourn et al., Nat. Biotechnol., 16: 778 (1998)); и (v) двойное антитело, представляющее собой димер полипептидных цепей, где каждая полипептидная

5 цепь содержит VH, соединенный с VL пептидным линкером, который является слишком коротким, чтобы позволить спаривание VH и VL на одной и той же полипептидной цепи, тем самым обеспечивая спаривание комплементарных доменов различных VH-VL полипептидных цепей для образования димерной молекулы, имеющей два функциональных антигенсвязывающих участка.

10 Фрагменты антител известны в данной области и описаны более подробно, например, в публикации патентной заявки США 2009/0093024 A1. В предпочтительном воплощении фрагмент распознавания антигена в CAR, кодируемый нуклеиновокислотной последовательностью согласно изобретению, содержит одноцепочечный анти-BCMA-Fv (scFv).

15 [0029] Антигенсвязывающая часть или фрагмент моноклонального антитела может иметь любой размер при условии, что эта часть связывается с BCMA. В этом отношении антигенсвязывающая часть или фрагмент моноклонального антитела, направленного против BCMA (также называемого здесь "моноклональным анти-BCMA-антителом"), желательно, содержит от

20 примерно 5 до 18 аминокислот (например, примерно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, или в диапазоне, определенном любыми двумя из указанных выше значений).

[0030] В одном воплощении нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению кодирует фрагмент распознавания антигена, который

25 содержит вариабельную область моноклонального анти-BCMA-антитела. В этом отношении фрагмент распознавания антигена содержит вариабельную область легкой цепи, вариабельную область тяжелой цепи, или и вариабельную область легкой цепи, и вариабельную область тяжелой цепи моноклонального анти-BCMA-антитела. Предпочтительно, фрагмент распознавание антигена в CAR,

30 кодируемый нуклеиновокислотной последовательностью согласно изобретению, включает вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи моноклонального анти-BCMA-антитела. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей моноклонального антитела, которое связывается с BCMA, раскрыты, например, в публикации международной

35 патентной заявки WO 2010/104949.

[0031] В другом воплощении нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению кодирует CAR, который включает сигнальную

последовательность. Сигнальная последовательность может быть расположена на amino-конце фрагмента распознавания антигена (например, переменная область анти-BCMA-антитела). Сигнальная последовательность может содержать любую подходящую сигнальную последовательность. В одном воплощении сигнальная последовательность представляет собой последовательность рецептора человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) или сигнальную последовательность CD8 α .

[0032] В другом воплощении CAR содержит шарнирную последовательность. Специалисту в данной области будет понятно, что шарнирная последовательность является короткой последовательностью аминокислот, которая облегчает гибкость антитела (см., например, Woof et al., Nat. Rev. Immunol., 4(2): 89-99 (2004)). Шарнирная последовательность может быть расположена между фрагментом распознавания антигена (например, анти-BCMA-scFv) и фрагментом Т-клеточной активации. Шарнирная последовательность может быть любой подходящей последовательностью, полученной из любой подходящей молекулы. В одном воплощении, например, шарнирная последовательность получена из молекулы человеческого CD8 α или молекулы CD28.

[0033] Нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению кодирует CAR, содержащий фрагмент Т-клеточной активации. Фрагмент Т-клеточной активации может быть любым подходящим фрагментом, полученным из любой подходящей молекулы. В одном воплощении, например, фрагмент Т-клеточной активации содержит трансмембранный домен. Трансмембранный домен может быть любым трансмембранным доменом, полученным из любой молекулы, известной в данной области. Например, трансмембранный домен может быть получен из молекулы CD8 α или из молекулы CD28. CD8 является трансмембранным гликопротеином, который выступает в качестве корецептора Т-клеточного рецептора (TCR) и экспрессируется в основном на поверхности цитотоксических Т-клеток. Наиболее распространенная форма CD8 существует в виде димера, состоящего из цепей CD8 α и CD8 β . CD28 экспрессируется на Т-клетках и обеспечивает костимулирующие сигналы, необходимые для активации Т-клеток. CD28 является рецептором для CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2). В предпочтительном воплощении CD8 α и CD28 являются человеческими.

[0034] В дополнение к трансмембранному домену фрагмент Т-клеточной активации также содержит внутриклеточный (т.е. цитоплазматический) домен сигналинга Т-клеток. Домен межклеточного сигналинга Т-клеток может быть

получен из молекулы CD28, молекулы CD3 дзета (ζ) или их модифицированных версий, из человеческой гамма-цепи Fc-рецептора (FcR γ), молекулы CD27, молекулы OX40, молекулы 4-1BB или других молекул внутриклеточного сигналинга, известных в данной области. Как обсуждалось выше, CD28 представляет собой Т-клеточный маркер, важный для костимуляции Т-клеток. CD3 ζ ассоциирует с TCR, чтобы сформировать сигнал, и содержит иммунорецепторные активирующие тирозинсодержащие повторы (ITAM). 4-1BB, также известный как CD137, передает мощный костимулирующий сигнал на Т-клетки, усиливая дифференцировку и повышая долгосрочное выживание Т-лимфоцитов. В предпочтительном воплощении CD28, CD3 дзета, 4-1BB, OX40 и CD27 являются человеческими.

[0035] Домен Т-клеточной активации CAR, кодируемый нуклеиновокислотной последовательностью согласно изобретению, может содержать любой из вышеупомянутых трансмембранных доменов и любой один или более чем один из вышеупомянутых доменов межклеточного сигналинга Т-клеток в любой комбинации. Например, нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению может кодировать CAR, содержащий трансмембранный домен CD28 и внутриклеточные домены Т-клеточного сигналинга CD28 и CD3 дзета. Альтернативно, например, нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению может кодировать CAR, содержащий трансмембранный домен CD8 α и внутриклеточные домены Т-клеточного сигналинга CD28, CD3 дзета, гамма-цепи Fc-рецептора (FcR γ) и/или 4-1BB.

[0036] В одном воплощении нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению кодирует CAR, который содержит в направлении от 5' к 3' сигнальную последовательность рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (рецептора GM-CSF), анти-BCMA-scFv, шарнирную и трансмембранную области молекулы человеческого CD8 α , цитоплазматический домен Т-клеточного сигналинга молекулы человеческого CD28 и домен Т-клеточного сигналинга молекулы человеческого CD3 ζ . В другом воплощении нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению кодирует CAR, который содержит в направлении от 5' к 3' сигнальную последовательность человеческого CD8 α , анти-BCMA-scFv, шарнирную и трансмембранную области молекулы человеческого CD8 α , цитоплазматический домен Т-клеточного сигналинга молекулы человеческого CD28 и домен Т-клеточного сигналинга молекулы человеческого CD3 ζ . В другом воплощении нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению кодирует CAR, который содержит в направлении от 5' к 3' сигнальную последовательность

человеческого CD8 α , анти-BCMA-scFv, шарнирную и трансмембранную области молекулы человеческого CD8 α , цитоплазматическую область Т-клеточного сигналинга человеческой молекулы 4-1BB и/или цитоплазматическую область Т-клеточного сигналинга молекулы человеческого OX40, и домен Т-клеточного сигналинга молекулы человеческого CD3 ζ . Например, нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению содержит или состоит из нуклеиновокислотной последовательности SEQ ID № 1, SEQ ID № 2 или SEQ ID № 3.

[0037] Изобретение также относится к выделенному или очищенному химерному рецептору антигена (CAR), кодируемому нуклеиновокислотной последовательностью согласно изобретению.

[0038] Нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению может кодировать CAR любой длины, т.е. CAR может содержать любое число аминокислот, при условии, что CAR сохраняет свою биологическую активность, например, способность специфически связываться с антигеном, обнаруживать больные клетки у млекопитающих или лечить или предотвращать заболевание у млекопитающего и т.д. Например, CAR может содержать 50 или более (например, 60 или более, 100 или более, или 500 или более аминокислот), но меньше 1000 (например, 900 или менее, 800 или менее, 700 или менее, или 600 или менее) аминокислот. Предпочтительно, CAR имеет от примерно 50 до примерно 700 аминокислот (например, примерно 70, примерно 80, примерно 90, примерно 150, примерно 200, примерно 300, примерно 400, примерно 550, или примерно 650 аминокислот), от примерно 100 до примерно 500 аминокислот (например, примерно 125, примерно 175, примерно 225, примерно 250, примерно 275, примерно 325, примерно 350, примерно 375, примерно 425, примерно 450, или примерно 475 аминокислот), или в диапазоне, определяемом любыми двумя из указанных выше значений.

[0039] В объем данного изобретения включены нуклеиновокислотные последовательности, которые кодируют функциональные части CAR, описанные в данном документе. Термин "функциональная часть", используемый в отношении к CAR, относится к любой части или фрагменту CAR согласно изобретению, где часть или фрагмент сохраняет биологическую активность того CAR, частью которого он является (родительского CAR). Функциональные части охватывают, например, те части CAR, которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени или обнаруживать, излечивать или предотвращать заболевание в подобной степени, в той же степени или в большей степени, чем родительский CAR. В отношении нуклеиновокислотной последовательности,

кодирующей родительский CAR, нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая функциональную часть CAR, может кодировать белок, содержащий, например, примерно 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% или более родительского CAR.

5 [0040] Нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению может кодировать функциональную часть CAR, которая содержит дополнительные аминокислоты на амино- или карбокси-конце этой части или на
10 обоих концах, где дополнительные аминокислоты не найдены в аминокислотной последовательности родительского CAR. Желательно, чтобы дополнительные аминокислоты не мешали биологической функции функциональной части, например, распознаванию клетки-мишени, обнаружению рака, лечению или профилактике рака и т.д. Более предпочтительно, чтобы дополнительные аминокислоты повышали биологическую активность CAR по сравнению с биологической активностью родительского CAR.

15 [0041] Данное изобретение также относится к нуклеиновокислотным последовательностям, кодирующим функциональные варианты вышеупомянутого CAR. Термин "функциональный вариант", используемый в данном документе, относится к CAR, полипептиду или белку, имеющему существенную или значительную идентичность или сходство
20 последовательности с CAR, закодированным нуклеиновокислотной последовательностью согласно изобретению, при этом функциональный вариант сохраняет биологическую активность CAR, вариантом которого она является. Функциональные варианты охватывают, например, те варианты CAR, описанные в данном документе (родительский CAR), которые сохраняют способность
25 распознавать клетки-мишени в подобной степени, в той же степени или в большей степени, чем родительский CAR. В отношении нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей родительский CAR, нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая функциональный вариант CAR, может быть, например, примерно на 10% идентична, примерно на 25% идентична, примерно
30 на 30% идентична, примерно на 50% идентична, примерно на 65% идентична, примерно на 80% идентична, примерно на 90% идентична, примерно на 95% идентична или примерно на 99% идентична нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей родительский CAR.

[0042] Функциональный вариант может, например, включать
35 аминокислотную последовательность CAR, закодированную нуклеиновокислотной последовательностью согласно изобретению, по меньшей мере с одной консервативной аминокислотной заменой. Фраза "консервативная

аминокислотная замена" или "консервативная мутация" относится к замене одной аминокислоты другой аминокислотой с общими свойствами. Функциональным способом определить общие свойства у отдельных аминокислот является анализ нормированных частот аминокислотных замен в соответствующих белках гомологичных организмов (Schulz, G. E. and Schirmer, R. H., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979)). Согласно таким анализам могут быть определены группы аминокислот, где аминокислоты в пределах группы заменяются преимущественно друг на друга, и поэтому наиболее похожи друг на друга по их влиянию на общую структуру белка (Schulz, G. E. and Schirmer, R. H., см. выше). Примеры консервативных мутаций включают аминокислотные замены аминокислот внутри подгрупп, описанных выше, например, лизина на аргинин и наоборот таким образом, чтобы положительный заряд мог быть сохранен; глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту и наоборот таким образом, чтобы отрицательный заряд мог быть сохранен; серина на треонин таким образом, чтобы свободный -ОН мог быть сохранен; и глутамин на аспарагин таким образом, чтобы свободный -NH₂ мог быть сохранен.

[0043] Альтернативно или дополнительно, функциональные варианты могут включать аминокислотную последовательность родительского CAR по меньшей мере с одной неконсервативной аминокислотной заменой. "Неконсервативные мутации" включают замены аминокислот из различных групп, например, лизина на триптофан или фенилаланина на серин и т.д. В этом случае для неконсервативной аминокислотной замены предпочтительно, чтобы она не мешала или не ингибировала биологическую активность функционального варианта. Неконсервативная аминокислотная замена может повысить биологическую активность функционального варианта, так что биологическая активность функционального варианта увеличивается по сравнению с родительским CAR.

[0044] Нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению может кодировать CAR (в том числе его функциональные части и функциональные варианты), который включает синтетические аминокислоты вместо одной или более чем одной природной аминокислоты. Такие синтетические аминокислоты известны в данной области и включают, например, аминокислоты циклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин, α-амино-п-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинометилцистеин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, 4-хлорофенилаланин, 4-карбоксифенилаланин, β-фенилсерингидроксифенилаланин, β-фенилглицин, α-нафтилаланин, циклогексилаланин, циклогексилглицин, индолин-2-карбоновую

кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, аминомалоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты, N'-бензил-N'-метиллизин, N',N'-дибензиллизин, 6-гидроксилизин, орнитин, α-аминоциклопентанкарбоновую кислоту, α-аминоциклогексанкарбоновую кислоту, α-аминоциклогептанкарбоновую кислоту, α-(2-амино-2-норборнан)карбоновую кислоту, α,γ-диаминомасляную кислоту, α,β-диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин и α-трет-бутилглицин.

[0045] Нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению может кодировать CAR (в том числе его функциональные части и функциональные варианты), который гликозилирован, амидирован, карбоксилирован, фосфорилирован, этерифицирован, N-ацилирован, циклизован, например, через дисульфидный мостик, или превращен в кислотно-аддитивную соль и/или, возможно, димеризован, полимеризован или конъюгирован.

[0046] В предпочтительном воплощении нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению кодирует CAR, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID № 4, SEQ ID № 5, SEQ ID № 6, SEQ ID № 8, SEQ ID № 9, SEQ ID № 10, SEQ ID № 11 или SEQ ID № 12.

[0047] Нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению может быть получена с использованием способов, известных в данной области. Например, нуклеиновокислотные последовательности, полипептиды и белки могут быть получены рекомбинантным путем с использованием стандартных методик рекомбинантной ДНК (см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994). Кроме того, синтетически полученная нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая CAR, может быть выделена и/или очищена из источника, такого как растение, бактерия, насекомое или млекопитающее, например, крыса, человек и т.д. Способы выделения и очистки хорошо известны в данной области. Альтернативно, нуклеиновокислотные последовательности, описанные в данном документе, могут быть синтезированы коммерческим образом. В этом отношении нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению может быть синтетической, рекомбинантной, выделенной и/или очищенной.

[0048] Данное изобретение также относится к вектору, содержащему нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую CAR согласно изобретению. Вектор может быть, например, плазмидой, космидой, вирусным

вектором (например, ретровирусным или аденовирусным) или фагом. Подходящие векторы и способы получения векторов хорошо известны в данной области (например, Sambrook et al., см. выше, и Ausubel et al., см. выше).

[0049] В дополнение к нуклеиновокислотной последовательности согласно изобретению, кодирующей CAR, вектор предпочтительно содержит последовательности, контролирующие экспрессию, такие как промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, терминаторы транскрипции, внутренние сайты посадки рибосомы (IRES) и т.п., которые обеспечивают экспрессию нуклеиновокислотной последовательности в клетке-хозяине.

Иллюстративные последовательности, контролирующие экспрессию, известны в данной области и описаны, например, в Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

[0050] Большое число промоторов из множества различных источников, включая конститутивные, индуцибельные и репресслируемые промоторы, хорошо известны в данной области. Типичными источниками промоторов являются, например, вирусы, млекопитающие, насекомые, растения, дрожжи и бактерии, и подходящие промоторы из этих источников легко доступны или могут быть получены синтетическим путем на основании общедоступных последовательностей, например, из депозитариев, таких как ATCC, а также из других коммерческих или личных источников. Промоторы могут быть однонаправленными (т.е. инициировать транскрипцию в одном направлении) или двунаправленными (т.е. инициировать транскрипцию либо в 3'-, либо в 5'-направлении). Неограничивающие примеры промоторов включают, например, систему бактериальной экспрессии T7, систему бактериальной экспрессии pBAD (araA), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40 и промотор RSV. Индуцируемые промоторы включают, например, систему Tet (патенты США 5464758 и 5814618), индуцируемую систему экдизона (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 3346-3351 (1996)), систему T-REXTM (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния), систему LACSWITCHTM (Stratagene, Сан-Диего, Калифорния) и систему тамоксифен-индуцируемой рекомбиназы Cre-ERT (Indra et al., Nuc. Acid. Res., 27: 4324-4327 (1999); Nuc. Acid. Res., 28: e99 (2000); патент США 7112715; и Kramer & Fussenegger, Methods Mol. Biol., 308: 123-144 (2005)).

[0051] Термин "энхансер", используемый в данном документе, относится к последовательности ДНК, которая повышает транскрипцию, например, нуклеиновокислотной последовательности, с которой она функционально связана. Энхансеры могут быть расположены за много тысяч пар нуклеотидов в стороне от кодирующей области нуклеиновокислотной последовательности и

могут опосредовать связывание регуляторных факторов, паттерны метилирования ДНК или изменения в структуре ДНК. Большое число энхансеров из множества различных источников хорошо известны в данной области и доступны в виде или внутри клонированных полинуклеотидов (например, из таких депозитариев как ATCC, а также других коммерческих или личных источников). Большое число полинуклеотидов, содержащих промоторы (например, часто используемый промотор CMV), также содержат энхансерные последовательности. Энхансеры могут быть расположены выше, в пределах или ниже кодирующих последовательностей. Термин "энхансеры Ig" относится к энхансерным элементам, полученным из энхансерных областей, картированных в пределах иммуноглобулинового (Ig) локуса (такие энхансеры включают, например, 5'-энхансеры тяжелой цепи (мю), 5'-энхансеры легкой цепи (каппа), интронные энхансеры каппа и мю и 3'-энхансеры (см. в целом Paul W.E. (ed), *Fundamental Immunology*, 3rd Edition, Raven Press, New York (1993), pages 353-363; и патент США 5885827).

[0052] Вектор также может содержать "ген селективного маркера". Термин "ген селективного маркера", используемый в данном документе, относится к нуклеиновокислотной последовательности, которая позволяет клеткам экспрессировать нуклеиновокислотную последовательность, чтобы быть специфически выбранными в пользу него или против, в присутствии соответствующего селективного агента. Подходящие селективные маркерные гены известны в данной области и описаны, например, в международных патентных заявках WO 1992/08796 и WO 1994/28143; Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 3567 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1527 (1981); Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2072 (1981); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150: 1 (1981); Santerre et al., *Gene*, 30: 147 (1984); Kent et al., *Science*, 237: 901-903 (1987); Wigler et al., *Cell*, 11: 223 (1977); Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48: 2026 (1962); Lowy et al., *Cell*, 22: 817 (1980); и патентах США 5122464 и 5770359.

[0053] В некоторых воплощениях вектор является "эписомальным экспрессионным вектором" или "эписомой", которая способна к репликации в клетке-хозяине и сохраняется в качестве внехромосомного сегмента ДНК в клетке-хозяине в присутствии соответствующего селективного давления (см., например, Conese et al., *Gene Therapy*, 11: 1735-1742 (2004)). Типичные коммерчески доступные эписомальные экспрессионные вектора включают, но не ограничиваясь ими, эписомальные плазмиды, которые используют ядерный антиген вируса Эпштейна-Барр 1 (EBNA1) и сайт начала репликации (oriP) вируса

Эпштейна-Барр (EBV). Векторы pREP4, pCEP4, pREP7 и pcDNA3.1 от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) и pBK-CMV от Stratagene (Ла Жолла, Калифорния) являются неограничивающими примерами эписомального вектора, который использует Т-антиген и сайт начала репликация SV40 вместо EBNA1 и oriP.

5 [0054] Другие подходящие векторы включают интегрирующие экспрессионные векторы, которые могут случайным образом интегрировать в ДНК клетки-хозяина, или могут включать сайт рекомбинации для включения специфической рекомбинации между экспрессионным вектором и хромосомой клетки-хозяина. Такие интегрирующие экспрессионные векторы могут
10 использовать эндогенные последовательности, контролирующей экспрессию хромосом клетки-хозяина, чтобы осуществить экспрессию желаемого белка. Примеры векторов, которые интегрируют сайт-специфическим образом, включают, например, компоненты системы Flp-In от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) (например, pcDNA™5/FRT), или системы Cre-lox, такие, как могут
15 быть найдены в pExchange-6 Core Vectors от Stratagene (Ла Жолла, Калифорния). Примеры векторов, которые случайным образом интегрируют в хромосомы клетки-хозяина, включают, например, pcDNA3.1 (при введении в отсутствие Т-антигена) от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) и pCI или pFN10A (ACT) FLEXI™ от Promega (Мадисон, Висконсин).

20 [0055] Также могут использоваться вирусные векторы. Типичные вирусные экспрессионные векторы включают, но не ограничиваясь ими, векторы на основе аденовирусов (например, система Per.C6 на основе аденовируса от Crucell, Inc. (Лейден, Нидерланды)), векторы на основе лентивируса (например, pLP1 на основе лентивируса от Life Technologies (Карлсбад, Калифорния)) и
25 ретровирусные векторы (например, pFB-ERV плюс pCFB-EGSH от Stratagene (La Jolla, CA)). В предпочтительном воплощении вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

[0056] Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту согласно изобретению, кодирующую CAR, может быть введен в клетку-хозяина, которая способна
30 экспрессировать CAR, закодированный таким образом, включая любую подходящую прокариотическую или эукариотическую клетку. Предпочтительными клетками-хозяевами являются те, которые могут быть легко и надежно выращены, имеют достаточно быстрые темпы роста, имеют хорошо охарактеризованные системы экспрессии и могут быть трансформированы или
35 трансфицированы легко и эффективно.

[0057] Используемый в данном документе термин "клетка-хозяин" относится к любому типу клеток, которые могут содержать экспрессионный

вектор. Клетка-хозяин может быть эукариотической клеткой, например, клеткой растения, животного, гриба или водоросли, или может быть прокариотической клеткой, например, бактерией или простейшим. Клетка-хозяин может быть культивированной клеткой или первичной клеткой, т.е. выделенной непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может быть прикрепленной клеткой или суспендированной клеткой, т.е. клеткой, которая растет в суспензии. Подходящие клетки-хозяева известны в данной области и включают, например, клетки DH5α *E. coli*, клетки яичников китайского хомячка, клетки обезьяны VERO, клетки COS, клетки HEK293 и т.п. Для амплификации или репликации рекомбинантного экспрессионного вектора клетка-хозяин может быть прокариотической клеткой, например, клеткой DH5α. Для получения рекомбинантного CAR клетка-хозяин может быть клеткой млекопитающего. Клетка-хозяин предпочтительно является клеткой человека. Клетка-хозяин может быть клеткой любого типа, может происходить из любого типа ткани и может находиться на любой стадии развития. В одном воплощении клетка-хозяин может быть лимфоцитом периферической крови (PBL), мононуклеарной клеткой периферической крови (PBMC) или натуральным киллером (NK). Предпочтительно клетка-хозяин является натуральным киллером (NK). Более предпочтительно, клетка-хозяин представляет собой Т-клетку. Способы выбора подходящих клеток-хозяев млекопитающих и способы трансформации, культивирования, амплификации, скрининга и очистки клеток известны в данной области.

[0058] Данное изобретение относится к выделенной клетки-хозяину, которая экспрессирует нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению, кодирующую CAR, описанный в данном документе. В одном воплощении клетка-хозяин представляет собой Т-клетку. Т-клеток согласно изобретению может быть любой Т-клеткой, такой как культивированная Т-клетка, например, первичная Т-клетка, или Т-клетка из культивированной Т-клеточной линии, или Т-клеткой, полученной от млекопитающего. Если Т-клетка получена от млекопитающего, то она может быть получена из различных источников, включая, но не ограничиваясь ими, кровь, костный мозг, лимфатические узлы, вилочковую железу или другие ткани или жидкости. Т-клетки также могут быть обогащены или очищены. Т-клетка предпочтительно представляет собой Т-клетку человека (например, выделенную из человека). Т-клетка может находиться на любой стадии развития, включая, но не ограничиваясь ими, CD4⁺/CD8⁺ дважды положительную Т-клетку, CD4⁺ Т-хелперную клетку, например, клетку Th₁ и Th₂, CD8⁺ Т-клетку (например, цитотоксическую Т-клетку), клетку, инфильтрирующую

опухоль, Т-клетку памяти, наивную Т-клетку и т.п. В одном воплощении Т-клетка представляет собой CD8⁺ Т-клетку или CD4⁺ Т-клетку. Т-клеточные линии могут быть получены, например, из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния) и Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), и включают, например, клетки Jurkat (ATCC TIB-152), клетки Sup-T1 (ATCC CRL-1942), клетки RPMI 8402 (DSMZ ACC-290), клетки Karpas 45 (DSMZ ACC-545) и их производные.

[0059] В другом воплощении клетка-хозяин представляет собой натуральный киллер (NK). NK-клетки являются типом цитотоксического лимфоцита, который играет определенную роль во врожденной иммунной системе. NK-клетки определяются как большие гранулярные лимфоциты и представляют собой третий вид клеток, дифференцирующихся из общего лимфоидного предшественника, который также дает В- и Т-лимфоциты (см., например, Immunobiology, 5th ed., Janeway et al., eds., Garland Publishing, New York, NY (2001)). NK-клетки дифференцируются и созревают в костном мозге, лимфатических узлах, селезенке, миндалинах и тимусе. После созревания NK-клетки вступают в кровоток в виде больших лимфоцитов с отдельными цитотоксическими гранулами. NK-клетки способны распознавать и убивать аномальные клетки, такие как, например, некоторые опухолевые клетки и инфицированные вирусом клетки, и, по-видимому, играют важную роль во врожденной иммунной защите от внутриклеточных патогенов. Как описано выше в отношении Т-клеток, NK-клетка может быть любой NK-клеткой, такой как культивированная NK-клетка, например, первичная NK-клетка или NK-клетка из культивируемой NK-клеточной линии, или NK-клеткой, полученной от млекопитающего. Если NK-клетка получена от млекопитающего, то она может быть получена из различных источников, включая, но не ограничиваясь ими, кровь, костный мозг, лимфатические узлы, вилочковую железу или другие ткани или жидкости. NK-клетки также могут быть обогащены или очищены. NK-клетка предпочтительно представляет собой NK-клетку человека (например, выделенную из человека). NK-клеточные линии могут быть получены, например, из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния) и включают, например, клетки NK-92 (ATCC CRL-2407), клетки NK92MI (ATCC CRL-2408), а также их производные.

[0060] Нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению, кодирующая CAR, может быть введена в клетку путем "трансфекции", "трансформации" или "трансдукции". Понятия "трансфекции", "трансформации" или "трансдукции", используемые в данном документе, относятся к введению

одного или более чем одного экзогенного полинуклеотида в клетку-хозяина с помощью физических или химических способов. Многие методики трансфекции известны в данной области и включают, например, копреципитацию ДНК фосфатом кальция (см., например, Murray E.J. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, *Gene Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1991)); DEAE-декстран; электропорацию; опосредованную катионными липосомами трансфекцию; бомбардировку микрочастицами, облегченную частицами вольфрама (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); и копреципитацию ДНК фосфатом стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)). Фаговые или вирусные векторы могут быть введены в клетки-хозяева после роста инфекционных частиц в подходящих упаковывающих клетках, многие из которых коммерчески доступны.

[0061] Без связи с конкретной теорией или механизмом, полагают, что, вызывая антигенспецифический ответ против BCMA, CAR, кодируемые нуклеиновокислотной последовательностью согласно изобретению, вызывают одно или более чем одно из следующих явлений: нацеливание и разрушение BCMA-экспрессирующих раковых клеток, уменьшение или устранение раковых клеток, облегчение инфильтрации мест(а) опухоли иммунными клетками и усиление/удлинение противораковых ответов. Таким образом, изобретение предлагает способ разрушения клеток множественной миеломы, который включает контактирование одной или более чем одной из вышеупомянутых выделенных Т-клеток или натуральных киллеров с популяцией клеток множественной миеломы, которые экспрессируют BCMA, где CAR образуется и связывается с BCMA на клетках множественной миеломы, и клетки множественной миеломы разрушаются. Как обсуждалось в данном документе, множественная миелома, также известная как миелома плазматических клеток или болезнь Келлера, представляет собой рак плазматических клеток, которые являются одним из видов белых кровяных клеток, в норме отвечающих за продукцию антител (Raab et al., *Lancet*, 374: 324-329 (2009)). Множественная миелома поражает 1-4 человека на 100000 человек в год. Заболевание чаще встречается у мужчин, и по неизвестным до сих пор причинам в два раза чаще у афроамериканцев, чем у американцев европеоидной расы. Множественная миелома является наиболее редким общегематологическим злокачественным заболеванием (14%) и составляет 1% от всех случаев рака (Raab et al., см. выше). Лечение множественной миеломы обычно включает химиотерапию в высоких дозах с последующей трансплантацией (аллогенной или аутологичной) гемопоэтических стволовых клеток; тем не менее, высокая частота рецидивов

является общим признаком пациентов с множественной миеломой, которые прошли такое лечение. Как обсуждалось выше, BCMA экспрессируется на высоком уровне клетками множественной миеломы (см., например, Novak et al., выше; Neri et al., выше; Bellucci et al., выше; и Moreaux et al., выше).

5 [0062] Одна или более чем одна выделенная Т-клетка, экспрессирующая нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению, кодирующую анти-BCMA CAR, описанный в данном документе, может контактировать с популяцией клеток множественной миеломы, которые экспрессируют BCMA *ex vivo*, *in vivo* или *in vitro*. "Ex vivo" относится к способам, проводимым в или на
10 клетках или ткани в искусственной среде вне организма с минимальным изменением природных условий. Напротив, термин "in vivo" относится к способу, который проводится в живых организмах в их нормальном, неповрежденном состоянии, в то время как способ "in vitro" проводится с использованием компонентов организма, которые были извлечены из своего обычного
15 биологического окружения. Способ согласно изобретению предпочтительно включает компоненты *ex vivo* и *in vivo*. В связи с этим, например, выделенные Т-клетки, описанные выше, могут быть культивированы *ex vivo* в условиях, подходящих для экспрессии нуклеиновокислотной последовательности согласно изобретению, кодирующей анти-BCMA-CAR, а затем непосредственно
20 перенесены млекопитающему (предпочтительно, человеку), страдающему от множественной миеломы. Такой способ переноса клеток в данной области называют "адоптивным переносом клеток (АСТ)", где полученные иммунные клетки пассивно переносят новому реципиенту, чтобы передать новому хозяину функциональные возможности иммунных клеток, полученных от донора. Способы
25 адоптивного переноса клеток для лечения различных видов рака, в том числе гематологических раков, таких как миелома, известны в данной области и описаны, например, в Gattinoni et al., Nat. Rev. Immunol., 6(5): 383-393 (2006); June, CH, J. Clin. Invest., 117(6): 1466-76 (2007); Rapoport et al., Blood, 117(3): 788-797 (2011); и Barber et al., Gene Therapy, 18: 509-516 (2011)).

30 [0063] Данное изобретение также предусматривает способ разрушения клеток лимфомы Ходжкина. Лимфома Ходжкина (ранее известная как болезнь Ходжкина) представляет собой рак иммунной системы, который отличается присутствием типа многоядерных клеток, называемых клетками Рида-Штернберга. Два основных типа лимфомы Ходжкина включают классическую
35 лимфому Ходжкина и узловую лимфому Ходжкина с преобладанием лимфоцитов. Лимфому Ходжкина в настоящее время лечат путем лучевой терапии, химиотерапии или трансплантации гемопоэтических стволовых клеток,

выбирая способ лечения в зависимости от возраста и пола пациента и стадии, объема и гистологического подтипа заболевания. Экспрессия BCMA была обнаружена на поверхности клеток лимфомы Ходжкина (см., например, Chiu et al., Blood, 109(2): 729-739 (2007)).

5 [0064] Когда Т-клетки или NK-клетки вводят млекопитающему, то эти клетки могут быть аллогенными или аутологичными для этого млекопитающего. В "аутологичных" способах введения клетки (например, кроветворные стволовые клетки или лимфоциты) удаляются из организма млекопитающего, сохраняются (и, возможно, модифицируются) и возвращаются обратно тому же
10 млекопитающему. В "аллогенных" способах введения млекопитающее получает клетки (например, кроветворные стволовые клетки или лимфоциты) от генетически подобного, но не идентичного донора. Предпочтительно клетки являются аутологичными млекопитающему.

[0065] Т-клетки или NK-клетки предпочтительно вводятся человеку в
15 форме композиции, такой как фармацевтическая композиция. Альтернативно, нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению, кодирующая CAR, или вектор, содержащий кодирующую CAR нуклеиновокислотную последовательность, могут быть составлены в композицию, такую как фармацевтическая композиция, и введены человеку. Фармацевтическая
20 композиция согласно изобретению может содержать популяцию Т-клеток или NK клеток, которые экспрессируют CAR согласно изобретению. В дополнение к нуклеиновокислотной последовательности согласно изобретению или к клеткам-хозяевам, которые экспрессируют CAR согласно изобретению, фармацевтическая композиция может содержать другие фармацевтически
25 активные агенты или препараты, такие как химиотерапевтические агенты, например, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубин, доксорубин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкрестин и т.п. В предпочтительном воплощении фармацевтическая композиция содержит выделенную Т-клетку или
30 NK-клетку, экспрессирующую CAR согласно изобретению, более предпочтительно популяцию Т-клеток или NK-клеток, которые экспрессируют CAR согласно изобретению.

[0066] Т-клетки или NK-клетки согласно изобретению могут быть предоставлены в форме соли, например, фармацевтически приемлемой соли.
35 Подходящие фармацевтически приемлемые кислотнo-аддитивные соли включают соли, полученные из минеральных кислот, таких как соляная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, а

также из органических кислот, таких как винная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, фумаровая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная и арилсульфокислоты, например, р-толуолсульфокислота.

[0067] Выбор носителя будет определяться частично конкретной согласно изобретению нуклеиновокислотной последовательностью, вектором или клетками-хозяевами, экспрессирующими CAR, а также конкретным способом, используемым для введения нуклеиновокислотной последовательности, вектора или клеток-хозяев, экспрессирующих CAR, согласно изобретению. Соответственно, существует множество приемлемых составов фармацевтической композиции данного изобретения. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. Возможно, может быть использована смесь двух или более консервантов. Консервант или его смеси, как правило, присутствуют в количестве от примерно 0,0001% до примерно 2% от общего веса композиции.

[0068] Кроме того, в композиции могут быть использованы буферные агенты. Подходящие буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. Возможно, может быть использована смесь двух или более буферных агентов. Буферный агент или его смеси, как правило, присутствуют в количестве от примерно 0,001% до примерно 4% от общего веса композиции.

[0069] Способы получения вводимой (например, вводимой парентеральным путем) композиции известны специалистам в данной области и описаны более подробно, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

[0070] Композиция, содержащая согласно изобретению нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую CAR, или клетки-хозяева, экспрессирующие CAR, может быть составлена как комплекс включения, такой как циклодекстриновый комплекс, или как липосома. Липосомы могут служить для нацеливания клеток-хозяев (например, Т-клеток или НК-клеток) или нуклеиновокислотной последовательности согласно изобретению на конкретную ткань. Липосомы могут быть также использованы для увеличения периода полужизни нуклеиновокислотной последовательности согласно изобретению. Для получения липосом доступны многие способы, такие как описанные, например, в Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980), и в патентах США 4235871, 4501728, 4837028 и 5019369.

[0071] Композиция может использовать систему с отсроченным высвобождением, замедленным высвобождением и пролонгированным высвобождением, так что доставка композиции согласно изобретению происходит до и в течение достаточно времени, чтобы вызвать сенсibilизацию места лечения. Многие типы систем доставки с отсроченным высвобождением доступны и известны специалистам в данной области. С помощью таких систем можно избежать повторных введений композиции, тем самым увеличивая удобство для субъекта и врача, и они могут быть особенно подходящими для определенных воплощений композиции данного изобретения.

[0072] Композиция желательно содержит клетки-хозяева, экспрессирующие нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению, кодирующую CAR, или вектор, содержащий нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению, в количестве, которое является эффективным для лечения или предотвращения множественной миеломы или лимфомы Ходжкина. Используемый в данном документе термин "лечение" относится к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Предпочтительно, эффект является терапевтическим, т.е. эффект частично или полностью излечивает заболевание и/или неблагоприятный симптом, свойственный заболеванию. Для этого способ согласно изобретению включает введение "терапевтически эффективного количества" композиции, содержащей клетки-хозяева, экспрессирующие нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению, кодирующую CAR, или вектор, содержащий нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению. Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как степень заболевания, возраст, пол и вес человека и способность CAR вызывать желаемый ответ у индивидуума. Например, терапевтически эффективное количество CAR согласно изобретению представляет собой количество, которое связывается с BCMA на клетках множественной миеломы и разрушает их.

[0073] Альтернативно, фармакологический и/или физиологический эффект может быть профилактическим, т.е. эффект полностью или частично предотвращает заболевание или его симптом. В этом отношении способ согласно изобретению включает введение "профилактически эффективного количества" композиции, содержащей клетки-хозяева, экспрессирующие

нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению, кодирующую CAR, или вектор, содержащий нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению, млекопитающему, который предрасположен к множественной миеломе или лимфоме Ходжкина. Понятие "профилактически эффективного количества" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата (например, предотвращения возникновения заболевания).

[0074] Типичное число клеток-хозяев, вводимых млекопитающему (например, человеку), может находиться, например, в диапазоне от 1 млн до 100 млрд клеток; тем не менее, в объем данного изобретения входят числа ниже или выше этого примерного диапазона. Например, суточная доза клеток-хозяев согласно изобретению может составлять от примерно 1 млн до примерно 50 млрд клеток (например, примерно 5 млн клеток, примерно 25 млн клеток, примерно 500 млн клеток, примерно 1 млрд клеток, примерно 5 млрд клеток, примерно 20 млрд клеток, примерно 30 млрд клеток, примерно 40 млрд клеток, либо диапазон определяется любыми двумя из указанных выше значений), предпочтительно от примерно 10 млн до примерно 100 млрд клеток (например, примерно 20 млн клеток, примерно 30 млн клеток, примерно 40 млн клеток, примерно 60 млн клеток, примерно 70 млн клеток, примерно 80 млн клеток, примерно 90 млн клеток, примерно 10 млрд клеток, примерно 25 млрд клеток, примерно 50 млрд клеток, примерно 75 млрд клеток, примерно 90 млрд клеток, либо диапазон определяется любыми двумя из указанных выше значений), более предпочтительно от примерно 100 млн клеток до примерно 50 млрд клеток (например, примерно 120 миллионов клеток, примерно 250 млн клеток, примерно 350 млн клеток, примерно 450 млн клеток, примерно 650 миллионов клеток, примерно 800 млн клеток, примерно 900 млн клеток, примерно 3 млрд клеток, примерно 30 млрд клеток, примерно 45 млрд клеток, либо диапазон определяется любыми двумя из вышеуказанных значений).

[0075] Терапевтическую или профилактическую эффективность можно контролировать путем периодического обследования пациентов. В случае многократных введений в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния лечение повторяют до желательного подавления симптомов заболевания. Тем не менее, другие режимы дозировки также могут быть использованы и входят в объем данного изобретения. Желаемая дозировка может быть доставлена путем однократного болюсного введения композиции,

повторных болюсных введений композиции или путем непрерывного инфузионного введения композиции.

[0076] Композицию, содержащую клетки-хозяева, которые экспрессируют кодирующую CAR нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению, или вектор, содержащий кодирующую CAR нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению, можно вводить в организм млекопитающего с помощью стандартных способов введения, в том числе пероральным, внутривенным, внутрибрюшинным, подкожным, легочным, трансдермальным, внутримышечным, интраназальным, трансбуккальным, сублингвальным путем или с помощью суппозитория. Композиция предпочтительно является подходящей для парентерального введения. Термин "парентеральное", используемый в данном документе, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. Более предпочтительно, композицию вводят млекопитающему путем периферийной системной доставки с помощью внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

[0077] Композицию, содержащую клетки-хозяева, которые экспрессируют кодирующую CAR нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению, или вектор, содержащий кодирующую CAR нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению, можно вводить с одним или более чем одним дополнительным терапевтическим агентом, который может быть совместно введен млекопитающему. Под "совместном введением" понимается введение одного или более чем одного дополнительного терапевтического агента и композиции, содержащей клетки-хозяева согласно изобретению или вектор согласно изобретению, достаточно близко по времени, так что CAR согласно изобретению может усилить эффект одного или более чем одного дополнительного терапевтического агента, или наоборот. В связи с этим композиция, содержащая клетки-хозяева согласно изобретению или вектор согласно изобретению, может быть введена первой, а один или более чем один дополнительный терапевтический агент может быть введен вторым, или наоборот. Альтернативно, композиция, содержащая клетки-хозяева согласно изобретению или вектор согласно изобретению, и один или более чем один дополнительный терапевтический агент могут быть введены одновременно. Примером терапевтического агента, который может быть введен совместно с композицией, содержащей клетки-хозяева согласно изобретению или вектор согласно изобретению, является IL-2.

[0078] После того как композицию, содержащую клетки-хозяева, экспрессирующие нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению, или вектор, содержащий кодирующую CAR нуклеиновокислотную последовательность согласно изобретению, вводят млекопитающему (например, 5 человеку), биологическая активность CAR может быть измерена любым подходящим способом, известным в данной области. В соответствии со способом согласно изобретению CAR связывается с BCMA на клетках множественной миеломы, и клетки множественной миеломы разрушаются. Связывание CAR с BCMA на поверхности клеток множественной миеломы может быть 10 проанализировано с помощью любого подходящего способа, известного в данной области, в том числе, например, ELISA и проточной цитометрии. Способность CAR разрушать клетки множественной миеломы может быть измерена с помощью любого подходящего способа, известного в данной области, такого как анализ цитотоксичности, описанный, например, Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), и Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004). Биологическую активность CAR также можно измерить путем анализа экспрессии некоторых цитокинов, таких как CD107a, IFN γ , IL-2 и TNF. 15

[0079] Специалист в данной области легко поймет, что нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению, кодирующая 20 CAR, может быть изменена с помощью любого числа способов, например, так, чтобы терапевтическая или профилактическая эффективность CAR увеличилась за счет модификации. Например, CAR может быть конъюгирован прямо или косвенно через линкер с целевой группировкой. Практика конъюгации соединений, например, CAR, с целевыми группировками известна в данной 25 области. См., например, Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 111 (1995) и патент США 5087616.

Настоящее изобретение может быть воплощено в следующем виде: выделенная или очищенная нуклеиновокислотная последовательность, 30 кодирующая химерный рецептор антигена (CAR), где CAR содержит фрагмент распознавания антигена и фрагмент Т-клеточной активации, и где фрагмент распознавания антигена направлен против антигена созревания В-клеток (BCMA).

Согласно одному из вариантов осуществления, фрагмент распознавания 35 антигена включает моноклональное антитело, направленное против BCMA, или его антигенсвязывающую часть.

Согласно одному из вариантов осуществления, фрагмент распознавания антигена содержит вариабельную область моноклонального антитела, направленного против BCMA.

Согласно одному из вариантов осуществления, фрагмент Т-клеточной активации содержит домен Т-клеточного сигналинга любого из следующих белков: человеческого белка CD8-альфа, человеческого белка CD28, человеческого белка CD3-дзета, человеческого белка FcR γ , белка CD27, белка OX40, человеческого белка 4-1BB, модифицированных версий любого из вышеперечисленных белков или любой комбинации вышеперечисленных белков.

Согласно одному из вариантов осуществления, выделенная или очищенная нуклеиновокислотная последовательность содержит нуклеиновокислотную последовательность SEQ ID № 1, SEQ ID № 2 или SEQ ID № 3.

Настоящее изобретение может быть воплощено в следующем виде: выделенный или очищенный CAR, кодируемый нуклеиновокислотной последовательностью согласно настоящему изобретению.

Согласно одному из вариантов осуществления, выделенный или очищенный CAR включает аминокислотную последовательность SEQ ID № 4, SEQ ID № 5, SEQ ID № 6, SEQ ID № 8, SEQ ID № 9, SEQ ID № 10, SEQ ID № 11 или SEQ ID № 12.

Настоящее изобретение может быть воплощено в следующем виде: вектор, содержащий выделенную или очищенную нуклеиновокислотную последовательность согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение может быть воплощено в следующем виде: выделенная клетка-хозяин, которая экспрессирует нуклеиновокислотную последовательность согласно настоящему изобретению.

Согласно одному из вариантов осуществления, выделенная клетка-хозяин экспрессирует CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID № 4, SEQ ID № 5, SEQ ID № 6, SEQ ID № 8, SEQ ID № 9, SEQ ID № 10, SEQ ID № 11 или SEQ ID № 12.

Согласно одному из вариантов осуществления, выделенная клетка-хозяин представляет собой Т-клетку.

Согласно одному из вариантов осуществления, выделенная клетка-хозяин является натуральным киллером (NK-клеткой).

Настоящее изобретение может быть воплощено в следующем виде: способ разрушения клеток множественной миеломы, который включает контактирование клеток множественной миеломы, экспрессирующих BCMA, с

выделенной или очищенной нуклеиновокислотной последовательностью согласно настоящему изобретению, где CAR продуцируется и связывается с BCMA на клетках множественной миеломы, и клетки множественной миеломы разрушаются.

5 Настоящее изобретение может быть воплощено в следующем виде: способ разрушения клеток множественной миеломы, который включает контактирование клеток множественной миеломы, экспрессирующих BCMA, с вектором согласно настоящему изобретению, где CAR продуцируется и связывается с BCMA на клетках множественной миеломы, и клетки
10 множественной миеломы разрушаются.

Настоящее изобретение может быть воплощено в следующем виде: способ разрушения клеток множественной миеломы, который включает контактирование клеток множественной миеломы, экспрессирующих BCMA, с одной или более чем одной из выделенных Т-клеток согласно настоящему
15 изобретению, где CAR продуцируется и связывается с BCMA на клетках множественной миеломы, и клетки множественной миеломы разрушаются.

Настоящее изобретение может быть воплощено в следующем виде: разрушения клеток множественной миеломы, который включает контактирование клеток множественной миеломы, экспрессирующих BCMA, с одной или более чем
20 одной из выделенных NK-клеток согласно настоящему изобретению, где CAR продуцируется и связывается с BCMA на клетках множественной миеломы, и клетки множественной миеломы разрушаются

Согласно одному из вариантов осуществления, клетки множественной миеломы являются человеческими.

25 Согласно одному из вариантов осуществления, клетки множественной миеломы находятся *in vitro*.

[0080] Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но, разумеется, не должны быть истолкованы как каким-либо образом
30 ограничивающие его объем.

Пример 1

[0081] Этот пример демонстрирует характер экспрессии BCMA на человеческих клетках.

35 [0082] Количественную полимеразную цепную реакцию (кПЦР, qPCR) проводили на панели образцов кДНК из широкого диапазона нормальных тканей, включенных в панель II Human Major Tissue qPCR (Origine Technologies, Роквилл,

Мэриленд), с использованием ВСМА-специфического праймера и набора зондов (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния). кДНК из клеток плазмоцитомы, которую резецировали у пациента с прогрессирующей множественной миеломой, анализировали в качестве положительного контроля. РНК экстрагировали из
 5 клеток плазмоцитомы с помощью мини-набора RNeasy (Qiagen, Inc., Валенсия, Калифорния), и синтезировали кДНК с помощью стандартных способов. Стандартную кривую для кПЦР ВСМА получали путем разведения плазмиды, кодирующей полноразмерную кДНК ВСМА (Origine Technologies, Роквилл, Мэриленд), в носителе ДНК. кПЦР точно определяла число копий ВСМА от 10^2 до
 10 10^9 на реакцию. Число копий кДНК β -актина в тех же тканях количественно оценивали с помощью праймера на β -актин Taqman и набора зондов (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния). Стандартную кривую β -актина получали путем амплификации серийных разведений плазмиды с β -актином. Все реакции кПЦР проводили на машине Roche LightCycler480 (Roche Applied Sciences,
 15 Индианополис, Индиана).

[0083] Результаты анализа кПЦР изображены на фиг. 1А и 1В. 93% клеток из образца плазмоцитомы были плазматическими клетками, что было определено с помощью проточной цитометрии. Экспрессия ВСМА в образце плазмоцитомы была значительно выше, чем экспрессия ВСМА в любой другой
 20 ткани. кДНК ВСМА была обнаружена в нескольких гематологических тканях, таких как мононуклеарные клетки периферической крови (PBMС), костный мозг, селезенка, лимфатический узел и миндалина. Низкие уровни кДНК ВСМА были обнаружены в большинстве органов желудочно-кишечного тракта, таких как двенадцатиперстная кишка, прямая кишка и желудок. Экспрессия ВСМА в
 25 органах желудочно-кишечного тракта может быть связана с плазматическими клетками и В-клетками, присутствующими в лимфоидной ткани кишечника, например в собственной пластинке и пейеровых бляшках (см., например, Brandtzaeg, Immunological Investigations, 39(4-5): 303-355 (2010)). Низкие уровни кДНК ВСМА также были обнаружены в семенниках и трахее. Низкие уровни кДНК
 30 ВСМА, обнаруженные в трахее, могут быть связаны с наличием плазматических клеток в собственной пластинке слизистой оболочки трахеи (см., например, Soutar, Thorax, 31(2):158-166 (1976)).

[0084] Экспрессию ВСМА дополнительно характеризовали с помощью проточной цитометрии на поверхности различных типов клеток (см. фиг. 2А-2L),
 35 включая линии клеток множественной миеломы H929, U266 и RPMI8226. Линии клеток множественной миеломы H929, U266 и RPMI8226 все экспрессировали ВСМА на клеточной поверхности. Напротив, клеточная линия саркомы TC71,

линия Т-клеточной лейкемии CCRF-CEM и линия клеток почки 293T-17 не экспрессировали BCMA на клеточной поверхности. Первичные гемопоэтические CD34⁺-клетки, первичные эпителиальные клетки малых дыхательных путей, первичные бронхиальные эпителиальные клетки и первичные эпителиальные клетки кишечника не экспрессировали BCMA на клеточной поверхности.

[0085] Результаты этого примера показывают, что BCMA экспрессируется на поверхности клеток множественной миеломы и имеет ограниченный характер экспрессии в нормальных тканях.

Пример 2

[0086] Этот пример описывает конструкцию нуклеиновокислотной последовательности согласно изобретению, кодирующей химерные антигенные анти-BCMA-рецепторы (CAR).

[0087] Последовательности двух мышинных антител против человеческого BCMA, обозначенных как "C12A3.2" и "C11D5.3", были получены из публикации международной патентной заявки WO 2010/104949 (Kalled et al.). Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи этих антител использовали для создания одноцепочечных переменных фрагментов (scFv), имеющих следующую общую структуру:

переменная область легкой цепи - линкер - переменная область тяжелой цепи.

[0088] Линкер имеет следующую аминокислотную последовательность: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID № 7) (см., например, Cooper et al., Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)).

[0089] Были разработаны последовательности ДНК, кодирующие два химерных антигенных рецептора, каждая из которых содержала следующие элементы в направлении от 5' к 3': сигнальную последовательность CD8 α , вышеупомянутую анти-BCMA-scFv, шарнирную и трансмембранную области молекулы человеческого CD8 α , цитоплазматический фрагмент молекулы CD28 и цитоплазматический фрагмент молекулы CD3 ζ . Схема этих нуклеиновокислотных последовательностей, кодирующих CAR, приведена на фиг. 3А. CAR, включающие переменные области из C12A3.2 и C11D5.3, были обозначены как анти-bcma1 и анти-bcma2, соответственно.

[0090] На основании описанного выше анти-bcma2-CAR были разработаны последовательности ДНК, кодирующие пять дополнительных химерных антигенных рецепторов, каждый из которых содержал различные сигнальные

- последовательности и домены Т-клеточной активации. В этом отношении 8ss-анти-bcma2-CAR содержал следующие элементы в направлении от 5' к 3': сигнальную последовательность CD8 α , scFv, шарнирную и трансмембранную области молекулы человеческого CD8 α , цитоплазматический фрагмент молекулы CD28 и цитоплазматический фрагмент молекулы CD3 ζ . G-анти-bcma2-CAR содержал следующие элементы в направлении от 5' к 3': сигнальную последовательность рецептора человеческого GM-CSF, scFv, шарнирную и трансмембранную области молекулы человеческого CD8 α , цитоплазматический фрагмент молекулы CD28 и цитоплазматический фрагмент молекулы CD3 ζ .
- Анти-bcma2-BB-CAR содержал следующие элементы в направлении от 5' к 3': сигнальную последовательность CD8 α , scFv, шарнирную и трансмембранную области молекулы человеческого CD8 α , цитоплазматический фрагмент молекулы 4-1BB и цитоплазматический фрагмент молекулы CD3 ζ . Анти-bcma2-OX40-CAR содержал следующие элементы в направлении от 5' к 3': сигнальную последовательность CD8 α , scFv, шарнирную и трансмембранную области молекулы человеческого CD8 α , цитоплазматический фрагмент молекулы OX40 (см., например, Latza et al., European Journal of Immunology, 24: 677-683 (1994)), и цитоплазматический фрагмент молекулы CD3 ζ . Анти-bcma2-BBOX40 содержал следующие элементы в направлении от 5' к 3': сигнальную последовательность CD8 α , scFv, шарнирную и трансмембранную области молекулы человеческого CD8 α , цитоплазматический фрагмент молекулы 4-1BB, цитоплазматический фрагмент молекулы OX40 и цитоплазматический фрагмент молекулы CD3 ζ . Элементы, присутствующие в каждой из семи последовательностей CAR, приведены в таблице 1.

Таблица 1

CAR	SEQ ID № (амино-кислотная)	Сигнальная последовательность	Шарнирная и трансмембранная области	Внутри-клеточный домен Т-клеточного сигналинга
анти-bcma1	4	Человеческий CD8A	Человеческий CD8A	CD28 CD3 ζ
анти-bcma2	5	Человеческий CD8A	Человеческий CD8A	CD28 CD3 ζ
G-Анти-bcma2	8	Рецептор GM-CSF	Человеческий CD8A	CD28 CD3 ζ
8ss-анти-bcma2	9	Человеческий CD8A	Человеческий CD8A	CD28 CD3 ζ
анти-bcma2-BB	10	Человеческий CD8A	Человеческий CD8A	4-1BB CD3 ζ
анти-bcma2	11	Человеческий CD8A	Человеческий CD8A	OX40

-OX40				CD3 ζ
анти- bcma2 - BBOX 40	12	Человеческий CD8A	Человеческий CD8A	4-1BB OX40 CD3 ζ

[0091] Последовательности, используемые для CD8 α , CD28, CD3 ζ , 4-1BB (CD137) и OX40 (CD134), были получены из общедоступной базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI).

[0092] Нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие CAR, были получены с использованием способов, известных в данной области, таких как описанные, например, в Kochenderfer et al., J. Immunology, 32(7): 689-702 (2009) и Zhao et al., J. Immunology, 183(9): 5563-5574 (2009). Нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую каждый CAR, подвергали оптимизации по кодонам и синтезировали с использованием технологии GeneArt™ (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) с соответствующими сайтами рестрикции.

[0093] Последовательности, кодирующие анти-bcma1- и анти-bcma2-CAR, лигировали в лентивирусную векторную плазмиду, обозначенную pRRLSIN.cPPT.MSCV.coDMF5.oPRE (см., например, Yang et al., J. Immunotherapy, 33(6): 648-658 (2010)). Часть CoDMF5 этого вектора была заменена нуклеиновокислотными последовательностями, кодирующими CAR, с помощью стандартных способов. Два полученных анти-BCMA-CAR-вектора были обозначены как pRRLSIN.cPPT.MSCV.anti-bcma1.oPRE и pRRLSIN.cPPT.MSCV.anti-bcma2.oPRE. Также был сконструирован отрицательный контроль CAR, содержащий scFv SP6, который распознает гаптен 2,4,6-тринитрофенил (см., например, Gross et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(24): 10024-10028 (1989)). Этот CAR был обозначен как SP6. SP6-CAR был клонирован в тот же лентивирусный вектор, что и анти-BCMA-CAR, и содержал те же сигнальные домены, что и анти-bcma1 и анти-bcma2. Супернатант, содержащий лентивирусы, кодирующие каждый CAR, получали в соответствии с протоколом, описанным в Yang et al., см. выше. В частности, клетки 293T-17 (ATCC CRL-11268) трансфицировали следующими плазмидами: pMDG (кодирующей белок оболочки вируса везикулярного стоматита), pMDLg/pRRE (кодирующей белки ВИЧ Gag и Pol), PRSV-Rev (кодирующей белок RSV Rev), и плазмидами, кодирующими анти-BCMA-CAR (например, Yang et al., см. выше).

[0094] Последовательности, кодирующие CAR G-анти-bcma2, 8ss-анти-bcma2, анти-bcma2-BB, анти-bcma2-OX40 и анти-bcma2-BBOX40, лигировали в гамма-ретровирусный плазмидный вектор, обозначенный как MSGV (сплайс-gag

вектор на основе вируса мышинных стволовых клеток) с использованием стандартных способов, таких как описанные, например, в Hughes et al., Human Gene Therapy, 16: 457-472 (2005). После того как были получены кодирующие CAR гамма-ретровирусные плазмиды, были созданы некомпетентные по репликации ретровирусы с оболочкой RD114 путем временной трансфекции упаковывающих клеток на основе 293, описанных в Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009).

[0095] Некомпетентные по репликации лентивирусы и ретровирусы, кодирующие описанные выше CAR, использовали для трансдукции Т-клеток человека. Для анти-bcma1 и анти-bcma2 Т-клетки культивировали, как описано выше (см., например, Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)) и стимулировали моноклональным анти-CD3-антителом ОКТ3 (Орто-Biotech, Хоршам, Пенсильвания) в среде AIM V™ (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), содержащей 5% человеческой АВ-сыворотки (Valley Biomedical, Винчестер, Вирджиния) и 300 международных единиц (МЕ)/мл интерлейкина-2 (Novartis Diagnostics, Эмеривилл, Калифорния). Через тридцать шесть часов после начала культивирования активированные Т-клетки суспендировали в лентивирусном супернатанте с сульфатом протамина и 300 МЕ/мл IL-2. Клетки центрифугировали в течение 1 часа при 1200g. Затем Т-клетки культивировали в течение трех часов при 37°C. Затем супернатант разводили 1:1 средой RPMI (Mediatech, Inc., Манассас, Вирджиния) + 10% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) и IL-2. Т-клетки культивировали в разведенном супернатанте в течение ночи, а затем возвращали в культуру в среде AIM V™ (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) с 5% человеческой АВ-сывороткой и IL-2. Т-клетки окрашивали мечеными биотином поликлональными козлиными антителами против мышинного F(ab)₂ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест Гроув, Пенсильвания) для обнаружения анти-BCMA-CAR. Высокие уровни экспрессии анти-bcma1-CAR, анти-bcma2-CAR, и SP6-CAR наблюдались на клеточной поверхности трансдуцированных Т-клеток, как показано на фиг. 3B-3D.

[0096] Для CAR G-анти-bcma2, 8ss-анти-bcma2, анти-bcma2-BB, анти-bcma2-OX40 и анти-bcma2-BBOX40 моноклеарные клетки периферической крови суспендировали в концентрации 1×10^6 клеток в 1 мл Т-клеточной среды, содержащей 50 нг/мл моноклонального анти-CD3-антитела ОКТ3 (Ortho, Бриджуотер, Нью-Джерси) и 300 МЕ/мл IL-2. Полипептид RETRONECTIN™ (Takara Bio Inc., Шига, Япония), который представляет собой рекомбинантный полипептид из фрагментов фибронектина человека, который связывает вирусы и

белки клеточной поверхности, растворяли в концентрации 11 мкг/мл в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS), и 2 мл полипептида RETRONECTIN™ в растворе PBS добавляли в каждую лунку 6-луночных планшетов, покрытых неклеточной культурой (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси).

- 5 Планшеты инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре (RT). После инкубации раствор RETRONECTIN™ аспирировали, и в каждую лунку, покрытую RETRONECTIN™, вносили 2 мл блокирующего раствора, состоящего из сбалансированного солевого раствора Хэнкса (HBSS) с 2% бычьим сывороточным альбумином (BSA). Планшеты инкубировали в течение 30 минут
- 10 при комнатной температуре (RT). Блокирующий раствор аспирировали, и лунки промывали раствором HBSS + 2,5% (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) (HEPES). Ретровирусный супернатант быстро размораживали и разводили 1:1 в Т-клеточной среде, и затем в каждую лунку, покрытую RETRONECTIN™, вносили 2 мл разведенного супернатанта.
- 15 После добавления супернатантов планшеты центрифугировали при 2000g в течение 2 часов при 32°C. Затем супернатант аспирировали из лунок и в каждую лунку добавляли 2×10^6 Т-клеток, которые были культивированы с ОКТ3-антителом и IL-2 в течение 2 дней. Когда Т-клетки вносили в планшет, покрытый ретровирусом, их суспендировали в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток на 1 мл Т-
- 20 клеточной среды плюс 300 МЕ/мл IL-2. После того как Т-клетки были добавлены в каждую лунку, планшеты центрифугировали в течение 10 минут при 1000g. Планшеты инкубировали при 37°C в течение ночи. Трансдукцию повторяли на следующий день. После 18-24-часовой инкубации Т-клетки удаляли из планшетов и суспендировали в свежей Т-клеточной среде с 300 МЕ/мл IL-2 в концентрации
- 25 $0,5 \times 10^6$ клеток на 1 мл и культивировали при 37°C и 5% CO₂. Наблюдались высокие уровни экспрессии анти-bcma2-BBOX40, анти-bcma2-BB, и 8ss-анти-bcma2 на поверхности трансдуцированных Т-клеток.

- [0097] Результаты этого примера демонстрируют способ получения нуклеиновокислотной последовательности согласно изобретению, кодирующей
- 30 CAR, и способ экспрессии CAR на поверхности Т-клеток.

Пример 3

[0098] Этот пример описывает серию экспериментов, используемых для определения специфичности CAR согласно изобретению к BCMA.

35

Клетки

[0099] NCI-H929, U266 и RPMI8226 все являются BCMA-положительными клеточными линиями множественной миеломы, которые получены из ATCC (ATCC №№ CRL-9068, TIB-196 и CCL-155, соответственно). A549 (ATCC № CCL-185) представляет собой BCMA-отрицательную клеточную линию рака легких.

5 TC71 представляет собой BCMA-отрицательную клеточную линию саркомы. CCRF-CEM представляет собой BCMA-отрицательную Т-клеточную линию (ATCC № CCL-119). BCMA-K562 представляет собой клетки K562 (ATCC № CCL-243), которые были трансдуцированы нуклеиновокислотной последовательностью, кодирующей полноразмерный BCMA. NGFR-K562 представляет собой клетки

10 K562, которые были трансдуцированы геном, кодирующим низкоаффинный рецептор фактора роста нервов (см, например, Kochenderfer et al., J. Immunotherapy., 32(7):689-702 (2009)). Были использованы лимфоциты периферической крови (PBL) от трех пациентов с множественной миеломой (т.е. пациенты с миеломой 1-3), а также PBL от трех других субъектов: донора А,

15 донора В и донора С. Доноры А-С все имели меланому. Первичные CD34⁺-клетки были получены от трех нормальных здоровых доноров. Образец клеток плазмцитомы был получен от пациента с миеломой 1, а образец костного мозга был получен от пациента с миеломой 3. Все образцы от людей, упомянутые выше, были получены от пациентов, включенных в IRB-утвержденные

20 клинические испытания в Национальном институте рака. Следующие первичные эпителиальные клетки человека были получены от Lonza, Inc. (Базель, Швейцария): эпителиальные клетки малых дыхательных путей, бронхиальные эпителиальные клетки и эпителиальные клетки кишечника.

25 ELISA на интерферон- γ и TNF

[0100] BCMA-положительные или BCMA-отрицательные клетки объединяли с CAR-трансдуцированными Т-клетками в дубликатах лунок 96-луночного круглодонного планшета (Corning Life Sciences, Лоуэлл, Массачусетс) в среде AIM V™ (Life Technologies, Карлсбад, CA) + 5% человеческой сыворотки.

30 Планшеты инкубировали при 37°C в течение 18-20 часов. После инкубации выполняли анализ ELISA на IFN γ и TNF с использованием стандартных способов (Pierce, Рокфорд, Иллинойс).

[0101] Т-клетки, трансдуцированные анти-bcma1- или анти-bcma2-CAR, продуцировали большие количества IFN γ , когда их культивировали в течение

35 ночи с BCMA-экспрессирующей клеточной линией BCMA-K562, но CAR-трансдуцированные Т-клетки продуцировали только фоновые уровни IFN γ , когда

их культивировали с отрицательным контролем, клеточной линией NGFR-K562, как указано в таблице 2 (все единицы: пг/мл IFN γ)□.

Таблица 2

	BCMA-экспрессирующие мишени**			BCMA-отрицательные мишени					
	BCMA-K562	H929	RPMI-8226	NGFR-K562	CCRF-CEM	A549	TC71	293T	только Т-клетки
Эффекторные клетки*									
анти-bcma1	15392	11306	5335	76	76	52	65	54	112
анти-bcma2	25474	23120	10587	62	67	32	31	28	41
SP6	32	60	149	27	28	21	361	73	27
Нетрансдуцированные	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	12	<12
Только мишени	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	13	

5

*Эффекторные клетки были Т-клетками от пациента с множественной миеломой (пациента с миеломой 2). Т-клетки трансдуцировали указанным CAR или оставляли нетрансдуцированными.

10 **Указанные клетки-мишени объединяли с эффекторных клеток для инкубации в течение ночи и проводили ELISA на IFN γ .

15 [0102] Т-клетки, экспрессирующие CAR 8ss-анти-bcma2, анти-bcma2-BB и анти-bcma2-OX40, продуцировали IFN γ специфически в ответ на BCMA-положительные клетки-мишени, когда Т-клетки и клетки-мишени совместно культивировали в течение ночи, как указано в таблице 3 (все единицы: пг/мл IFN γ).□□

Таблица 3

	BCMA-положительные мишени		BCMA-отрицательные мишени				
	BCMA-K562	RPMI-8226	NGFR-K562	CCRF-CEM	A549		только Т-клетки
Эффекторные клетки							
анти-bcma2-OX40	17704	4875	42	44	24		40
анти-bcma2-BB	25304	8838	404	602	350		706
8ss-анти-bcma2	9671	2168	100	120	49		171
Нетрансдуцированные	<12	57	15	17	<12		20

[0103] Т-клетки, трансдуцированные анти-BCMA-CAR, продуцировали большие объемы IFN γ , когда их культивировали в течение ночи с BCMA-экспрессирующими клеточными линиями множественной миеломы. Напротив, анти-BCMA-CAR продуцировали значительно более низкие количества IFN γ , когда их культивировали с различными BCMA-отрицательными клеточными линиями. По сравнению с Т-клетками, трансдуцированными анти-бсма1-CAR, Т-клетки, трансдуцированные анти-бсма2-CAR и его вариантами (т.е. 8ss-анти-бсма2, анти-бсма2-BB и анти-бсма2-OX40), продуцировали больше IFN γ при культивировании с BCMA-положительными клетками и меньше IFN γ при культивировании с BCMA-отрицательными клетками.

[0104] Т-клетки, трансдуцированные вариантами анти-бсма2-CAR, продуцировали TNF специфически в ответ на BCMA-положительные клетки-мишени, когда Т-клетки и клетки-мишени совместно культивировали в течение ночи, как указано в таблице 4 (все единицы: пг/мл фактора некроза опухоли (TNF)).

Таблица 4

	BCMA- положительные мишени		BCMA-отрицательные мишени			только Т-клетки
	BCMA-K562	RPMI-8226	NGFR-K562	CCRF-CEM	A549	
Эффекторные клетки						
анти-бсма2-OX40	4913	3406	<40	47	<40	74
анти-бсма2-BB	6295	2723	56	164	89	252
8ss-анти-бсма2	5340	1354	<40	121	<40	191
Нетрансдуцированные	<40	<40	47	<40	<40	<40

[0105] Так как Т-клетки, трансдуцированные анти-бсма2-CAR и его вариантами, демонстрировали чуть более сильное и более специфическое распознавание BCMA-экспрессирующих клеток, чем Т-клетки трансдуцированные анти-бсма1-CAR, то в последующих экспериментах были использованы только анти-бсма2-CAR и варианты анти-бсма2-CAR.

25 Анализ CD107a

[0106] Две популяции Т-клеток были получены в двух отдельных пробирках. Одна пробирка содержала BCMA-клетки K562, а другая пробирка содержала клетки NGFR-K562. Обе пробирки также содержали Т-клетки, трансдуцированные анти-бсма2-CAR и вариантами анти-бсма2-CAR, 1 мл AIM VTM среды (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) с 5% человеческой сыворотки, титрованную концентрацию анти-CD107a-антитела (eBioscience, Inc.,

Сан-Диего, Калифорния, клон eBioH4A3) и 1 мкл Golgi Stop (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси). Все пробирки инкубировали при 37°C в течение четырех часов, а затем окрашивали на экспрессию CD3, CD4 и CD8.

[0107] CAR-трансдуцированные Т-клетки от трех различных субъектов имели повышенную регуляцию CD107a специфически в ответ на стимуляцию с ВСМА-экспрессирующими клетками-мишенями (см. фиг. 4А-4С). Это указывает на возникновение ВСМА-специфической дегрануляции Т-клеток, которая является необходимым условием для перфорин-опосредованной цитотоксичности (см., например, Rubio et al., Nature Medicine, 9(11): 1377-1382 (2003)). Кроме того, Т-клетки, экспрессирующие варианты анти-bcma2-CAR (8ss-анти-bcma2, анти-bcma2-BB, анти-bcma2-OX40), дегранулировали ВСМА-специфическим образом при стимуляции с клетками-мишенями *in vitro*, как показано на фиг. 5А-5D.

Анализ внутриклеточного окрашивания цитокинов (intracellular cytokine staining assay, ICCS)

[0108] Популяция клеток ВСМА-K562 и популяция клеток NGFR-K562 были получены в двух отдельных пробирках, как описано выше. Обе пробирки также содержали Т-клетки, трансдуцированные анти-bcma2-CAR, от пациента с миеломой 2, 1 мл AIM V среды (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) с 5% человеческой сывороткой и 1 мкл Golgi Stop (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси). Все пробирки инкубировали при 37°C в течение шести часов. Поверхность клеток окрашивали анти-CD3-, анти-CD4-, и анти-CD8-антителами. Клетки подвергали пермеабиллизации и проводили внутриклеточное окрашивание на IFN γ (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, клон B27), IL-2 (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, клон MQ1-17H12) и TNF (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, клон MAb11), следуя инструкциям к набору Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси).

[0109] Большие популяции Т-клеток, трансдуцированных анти-bcma2-CAR, от пациента с миеломой 2 специфически продуцировали цитокины IFN γ , IL-2 и TNF ВСМА-специфическим образом после шестичасовой стимуляции с ВСМА-экспрессирующими клетками-мишенями, как показано на фиг. 6А-6С.

Анализ пролиферации

[0110] Оценивали способность Т-клеток, трансдуцированных анти-bcma2-CAR, к пролиферации при стимуляции с ВСМА-экспрессирующими клетками-мишенями. В частности, $0,5 \times 10^6$ облученных клеток ВСМА-562 или $0,5 \times 10^6$

облученных клеток NGFR-562 культивировали совместно с 1×10^6 общих Т-клеток, которые были трансдуцированы либо анти-bcma2-CAR, либо SP6-CAR. Т-клетки были помечены карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидиловым эфиром (CFSE) (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), как описано в Mannering et al., J. Immunological Methods, 283(1-2): 173-183 (2003). Среда, используемая в объединенных культурах, была средой AIM V™ (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) с 5% человеческой АВ-сыворотки. IL-2 к среде не добавляли. Через четыре дня после начала живые клетки в каждой объединенной культуре подсчитывали с помощью трипанового синего для исключения мертвых клеток.

Затем проводили проточную цитометрию путем окрашивания Т-клеток поликлональными мечеными биотином козлиными антителами против человеческого BCMA (R&D Systems, Миннеаполис), а затем стрептавидином (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси), анти-CD38-антителом (eBioscience, Inc., San Diego, CA) и анти-CD56-антителом (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси). Анализ данных проточной цитометрии выполняли с помощью программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc., Ашленд, Орегон).

[0111] Т-клетки, которые экспрессировали анти-bcma2-CAR, демонстрировали большее разведение CFSE при культивировании с клетками BCMA-K562, чем при культивировании с отрицательным контролем, клетками NGFR-K562, как показано на фиг. 7А. Эти результаты указывают на то, что Т-клетки, трансдуцированные анти-bcma2-CAR, специфически пролиферировали при стимуляции с BCMA-экспрессирующими клетками-мишенями. Напротив, никакой существенной разницы в разведении CFSE не было, когда Т-клетки, экспрессирующие SP6-CAR, культивировали либо с клетками-мишенями BCMA-K562, либо с клетками-мишенями NGFR-K562 (фиг. 7В), что указывает на отсутствие BCMA-специфической пролиферации Т-клеток, экспрессирующих SP6-CAR.

[0112] В начале анализа пролиферации $0,8 \times 10^6$ Т-клеток, экспрессирующих анти-bcma2-CAR, культивировали либо с клетками BCMA-K562, либо с клетками NGFR-K562. После 4 дней культивирования $2,7 \times 10^6$ Т-клеток, экспрессирующих анти-bcma2-CAR, присутствовало в культурах, содержащих клетки BCMA-K562, в то время как в культурах, содержащих клетки NGFR-K562, присутствовало только $0,6 \times 10^6$ Т-клеток, экспрессирующих анти-bcma2-CAR. Это BCMA-специфическое увеличение абсолютного числа Т-клеток, экспрессирующих анти-bcma2-CAR, указывает на то, что эти Т-клетки пролиферировали в ответ на BCMA.

[0113] Результаты этого примера показывают, что Т-клетки, экспрессирующие CAR согласно изобретению, демонстрируют ВСМА-специфическую продукцию цитокинов, дегрануляцию и пролиферацию.

5 Пример 4

[0114] В этом примере показано, что Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA-CAR согласно изобретению, могут разрушать клеточные линии множественной миеломы.

[0115] Анализы цитотоксичности выполняли, чтобы определить, могут ли
10 Т-клетки, трансдуцированные анти-bcma2-CAR, описанным в примерах 2 и 3, разрушать BCMA-экспрессирующие клеточные линии множественной миеломы (MM). Конкретно, цитотоксичность клеток-мишеней измеряли путем сравнения выживания BCMA-экспрессирующих клеток-мишеней (например, клеточных
линий множественной миеломы H929 и RPMI8226) относительно выживания
15 отрицательного контроля, клеток CCRF-CEM, с использованием анализа, описанного, например, в Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), и Hermans et al., J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004).

[0116] Приблизительно 50000 BCMA-экспрессирующих клеток-мишеней и 50000 клеток CCRF-CEM объединяли в одних и тех же пробирках с различным
20 числом CAR-трансдуцированных Т-клеток. Клетки отрицательного контроля CCRF-CEM метили флуоресцентным красителем 5-(и-6)-(((4-хлорметил)бензоил)амино)тетраметилпроламином (CMTMR) (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), а BCMA-экспрессирующие клетки-мишени метили CFSE. Во всех экспериментах цитотоксичность эффекторных Т-клеток,
25 трансдуцированных анти-bcma2-CAR, сравнивали с цитотоксичностью эффекторных Т-клеток отрицательного контроля от того же самого субъекта, которые были трансдуцированы SP6-CAR. Объединенные культуры находились в стерильных 5 мл пробирках (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси) в двух экземплярах в следующем соотношении Т-клеток и клеток-мишеней: 20,0:1, 7:1,
30 2:1 и 0,7:1. Культуры инкубировали в течение четырех часов при 37°C. Сразу же после инкубации добавляли 7-амино-актиномицин D (7AAD BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси). Для каждой объединенной культуры Т-клеток/клеток-мишеней определяли процент живых BCMA-экспрессирующих клеток-мишеней и живых клеток CCRF-CEM отрицательного контроля.

35 [0117] Для каждой объединенной культуры Т-клеток/клеток-мишеней определяли процент выживаемости BCMA-экспрессирующих клеток-мишеней по отношению к клеткам CCRF-CEM отрицательного контроля посредством деления

процента BCMA-экспрессирующих клеток на процент клеток CCRF-CEM отрицательного контроля. Скорректированный процент выживания BCMA-экспрессирующих клеток-мишеней рассчитывали путем деления процента живых BCMA-экспрессирующих клеток-мишеней в каждой объединенной культуре Т-клеток/клеток-мишеней на отношение процента BCMA-экспрессирующих клеток-мишеней к проценту клеток CCRF-CEM отрицательного контроля в пробирках, содержащих только BCMA-экспрессирующие клетки-мишени и клетки CCRF-CEM отрицательного контроля без эффекторных Т-клеток. Эта поправка была необходима для учета различий в исходных количествах клеток и спонтанной гибели клеток-мишеней. Цитотоксичность рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ цитотоксичности BCMA-экспрессирующих клеток-мишеней} = 100 - \text{скорректированный \% живых BCMA-экспрессирующих клеток-мишеней}$$

[0118] Результаты анализа цитотоксичности показаны на фиг. 7C и 7D. Т-клетки, трансдуцированные анти-bcma2-CAR, специфически убивали BCMA-экспрессирующие клеточные линии множественной миеломы H929 и RPMI8226. Напротив, Т-клетки, трансдуцированные SP6-CAR, обладали гораздо более низкими уровнями цитотоксичности против этих клеточных линий.

[0119] Результаты этого примера показывают, что нуклеиновокислотная последовательность согласно изобретению, кодирующая анти-BCMA-CAR, может быть использована в способе разрушения клеточных линий множественной миеломы.

Пример 5

[0120] В этом примере показано, что Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA-CAR согласно изобретению, могут разрушать первичные клетки множественной миеломы.

[0121] Первичные клетки множественной миеломы, описанные в примере 2, оценивали на экспрессию BCMA, а также на BCMA-специфическую продукцию цитокинов, дегрануляцию и пролиферацию с использованием способов, описанных выше.

[0122] Экспрессия BCMA на клеточной поверхности была обнаружена в четырех образцах первичной множественной миеломы, а также на первичных клетках множественной миеломы в костном мозге пациента с миеломой 3 (см. фиг. 8A). BCMA-экспрессирующие плазматические клетки составляли 40% клеток в образце костного мозга от пациента с миеломой 3. Аллогенные Т-клетки от донора С, трансдуцированные анти-bcma2-CAR, продуцировали IFN γ после совместного культивирования с необработанными клетками костного мозга от

пациента с миеломой 3, как показано на фиг. 8B. Т-клетки от того же аллогенного донора, трансдуцированные анти-*bcma2*-CAR, продуцировали гораздо меньше IFN γ , когда их культивировали с моноклеарными клетками периферической крови (PBMC) от пациента с миеломой 3. Кроме того, SP6-CAR-
 5 трансдуцированные Т-клетки от донора С специфически не распознавали костный мозг от пациента с миеломой 3. Ранее сообщалось, что нормальные PBMC не включают клетки, экспрессирующие BCMA (см., например, Ng et al., J. Immunology, 173(2): 807-817 (2004)). Чтобы подтвердить это наблюдение, PBMC от пациента 3 оценивали на экспрессию BCMA с помощью проточной
 10 цитометрии. PBMC от пациента 3 не включали BCMA-экспрессирующие клетки, отдельно от небольшой популяции клеток CD56+CD38^{high}, которая составила примерно 0,75% от PBMC. Эта популяция, возможно, состояла из циркулирующих клеток множественной миеломы.

[0123] Плазмоцитома, резецированная у пациента с миеломой 1, состояла
 15 на 93% из плазматических клеток, и эти первичные плазматические клетки экспрессировали BCMA, как показано на фиг. 8C. Т-клетки от пациента с миеломой 2 продуцировали IFN γ при культивировании с аллогенными необработанными клетками плазмоцитомы от пациента с миеломой 1. Т-клетки от пациента с миеломой 2 не продуцировали значительных количеств IFN γ при
 20 культивировании с PBMC от пациента с миеломой 1. Т-клетки от пациента с миеломой 2, трансдуцированные SP6-CAR, не продуцировали значительных количеств IFN γ , когда их культивировали либо с клетками плазмоцитомы, либо с PBMC от пациента с миеломой 1. PBMC от пациента с миеломой 1 не экспрессировали BCMA, что было измерено с помощью проточной цитометрии.

[0124] Т-клетки от пациента с миеломой 1, который ранее получил восемь
 25 циклов терапии против миеломы, были успешно культивированы и трансдуцированы лентивирусом вектором, кодирующим анти-*bcma2*-CAR. Через восемь дней после того, как культуры были иницированы, экспрессия анти-*bcma2*-CAR была обнаружена на 65% Т-клеток. Т-клетки от пациента с миеломой
 30 1, экспрессирующие анти-*bcma2*-CAR, продуцировали IFN γ специфически в ответ на аутологичные клетки плазмоцитомы (фиг. 8D). Т-клетки от пациента с миеломой 1, экспрессирующие SP6-CAR, не распознавали аутологичные клетки плазмоцитомы. Т-клетки, экспрессирующие анти-*bcma2*-CAR, и Т-клетки, экспрессирующие SP6-CAR, не распознавали аутологичные PBMC. Т-клетки от
 35 пациента с миеломой 1, экспрессирующие анти-*bcma2*-CAR, также специфически убивали аутологичные клетки плазмоцитомы при низком соотношении с мишенью. Напротив, Т-клетки от пациента с миеломой 1, экспрессирующие SP6-

CAR, демонстрировали низкие уровни цитотоксичности против аутологических клеток плазмоцитомы (фиг. 8E).

[0125] Результаты этого примера показывают, что анти-BCMA-CAR согласно изобретению может быть использован в способе разрушения первичных
5 клеток множественной миеломы.

Пример 6

[0126] В этом примере показано, что Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA-CAR согласно изобретению, могут разрушать верифицированные опухоли
10 у мышей.

[0127] Иммунодефицитным мышам NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, Jackson Laboratory) вводили внутривенно 8×10^6 клеток RPMI8226. Опухоли росли в течение 17-19 дней, а затем мыши получали внутривенные инфузии 8×10^6 человеческих Т-клеток, трансдуцированных либо
15 анти-bcma2-CAR, либо SP6-CAR. Опухоли измеряли циркулем каждые 3 дня. Самую большую длину и длину, перпендикулярную самой большой длине, перемножали, получая размер опухоли (площадь) в мм^2 . Когда самая большая длина достигала 15 мм, мышей умерщвляли. Исследования на животных были утверждены Комитетом по уходу и использованию животных Национального
20 института рака.

[0128] Результаты этого примера показаны на фиг. 9A и 9B. Примерно на 6-й день мыши, которым вводили анти-bcma2-трансдуцированные Т-клетки, продемонстрировали уменьшение размера опухоли, и опухоли были ликвидированы к 15-му дню. Кроме того, все мыши, которым вводили анти-
25 bcma2-трансдуцированные Т-клетки, дожили до 30 дня после инфузии Т-клеток.

[0129] Результаты этого примера показывают, что анти-BCMA-CAR согласно изобретению может разрушать клетки множественной миеломы *in vivo*.

[0130] Все ссылки, включая публикации, патентные заявки и патенты, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы про каждый объект ссылки было отдельно и конкретно
30 указано, что он включен посредством ссылки и изложен в данном документе во всей его полноте.

[0131] Использование терминов в единственном числе и аналогичные
35 объекты ссылки в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующей ниже формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее единственное число и множественное число, если иное не указано в данном

документе или это явно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий" и "включающий" должны быть истолкованы как неограничивающие термины (т.е. означающие "включающий, но не ограниченный этим"), если не указано иное. Указание диапазонов значений в данном документе является

5 только способом быстрой записи с индивидуальной ссылкой на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно приведено в данном документе. Все описанные здесь способы могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если это явно не

10 противоречит контексту или не указано иное. Использование в данном документе любых и всех примеров или иллюстративных выражений (например, "такой как") предназначено только для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничений на объем изобретения, если не заявлено иное. Отсутствие выражения в описании следует толковать как указание на любой незаявленный

15 элемент в качестве существенного в практике изобретения.

[0132] В данном документе описаны предпочтительные воплощения данного изобретения, включая наилучший способ, известный авторам изобретения, для осуществления данного изобретения. Вариации этих предпочтительных воплощений могут стать очевидными для специалистов в

20 данной области после прочтения приведенного выше описания. Изобретатели ожидают, что специалисты используют такие вариации в зависимости от обстоятельств, и изобретатели подразумевают, что изобретение будет осуществлено иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, данное изобретение включает все модификации и эквиваленты

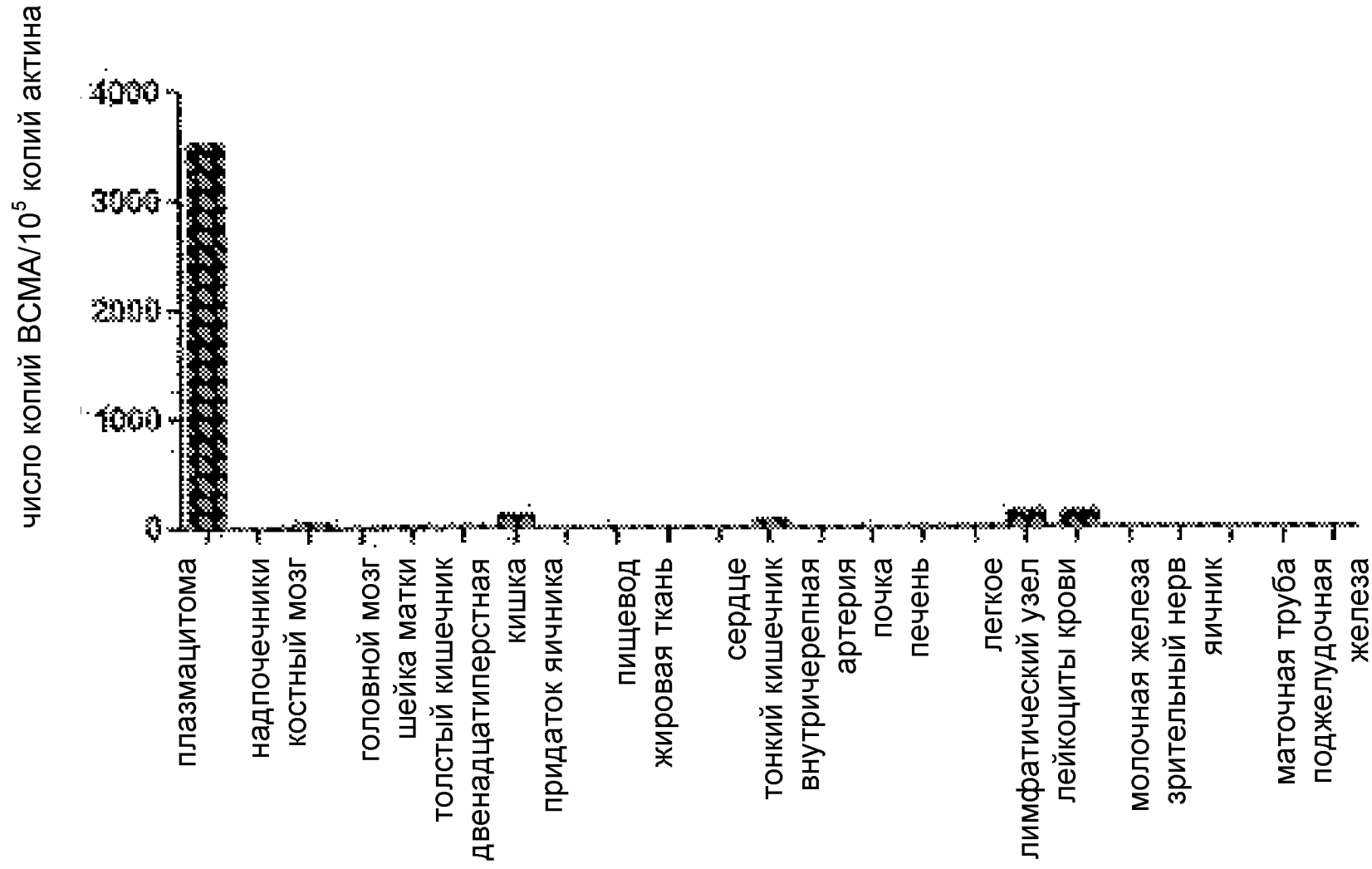
25 предмета, изложенного в формуле изобретения, прилагаемой к данному документу, предусмотренные действующим законодательством. Кроме того, любая комбинация описанных выше элементов во всех возможных вариантах охватывается изобретением, если это явно не противоречит контексту или в данном описании не указано иное.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

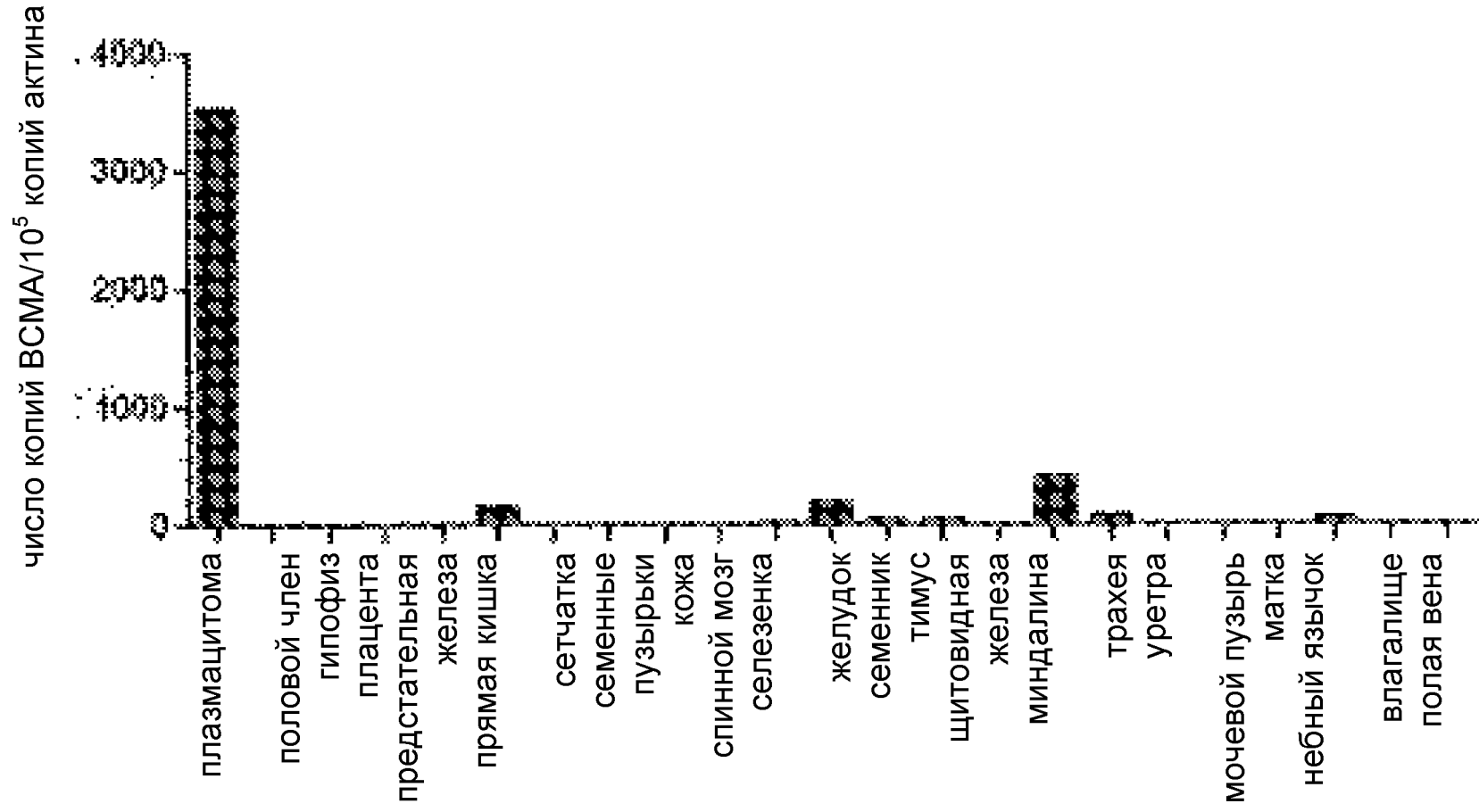
1. Химерный рецептор антигена (CAR), включающий:
 - 5 (a) одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), направленный против антигена созревания В-клеток (BCMA), содержащий (i) определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой цепи - CDR1, (ii) CDR2 тяжелой цепи, (iii) CDR3 тяжелой цепи, (iv) CDR1 легкой цепи, (v) CDR2 легкой цепи и (vi) CDR3 легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из
10 группы, состоящей из: SEQ ID № 4, SEQ ID № 5, SEQ ID № 6, SEQ ID № 8, SEQ ID № 9, SEQ ID № 10, SEQ ID № 11 и SEQ ID № 12;
 - (b) трансмембранный домен CD28 или CD8 α ; и
 - (c) один или более внутриклеточных доменов сигналинга Т-клеток, выделенных из белка, выбранного из группы, состоящей из: CD28, CD3 ζ , FcR γ ,
15 CD27, OX40 и белка 4-1BB.
2. CAR по п. 1, включающий трансмембранный домен CD28.
3. CAR по п. 1, включающий трансмембранный домен CD8 α .
4. CAR по любому из пп. 1-3, включающий внутриклеточные домены сигналинга Т-клеток CD28 и CD3 ζ .
- 20 5. CAR по любому из пп. 1-3, включающий внутриклеточные домены сигналинга Т-клеток OX40 и CD3 ζ .
6. CAR по любому из пп. 1-3, включающий внутриклеточные домены сигналинга Т-клеток 4-1BB и CD3 ζ .
7. CAR по п. 1, включающий трансмембранный домен CD8 α и
25 внутриклеточные домены сигналинга Т-клеток 4-1BB и CD3 ζ
8. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR по любому из пп. 1-7.
9. Экспрессионный вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 8.
- 30 10. Экспрессионный вектор по п. 9, где указанный вектор представляет собой ретровирусный вектор.
11. Экспрессионный вектор по п. 10, где указанный ретровирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.
12. Выделенная клетка, которая экспрессирует CAR по любому из пп. 1-
35 7.
13. Выделенная клетка, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 8.

14. Выделенная клетка, содержащая вектор по любому из пп. 9-11.
15. Выделенная клетка по любому из пп. 12-14, которая представляет собой Т-клетку.
16. Выделенная клетка по любому из пп. 12-14, которая является натуральным киллером (NK-клеткой).
17. Композиция, содержащая выделенную клетку по любому из пп. 12-16 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.
18. Способ разрушения клеток множественной миеломы, который включает контактирование клеток множественной миеломы, экспрессирующих ВСМА, с одной или более чем одной из выделенных Т-клеток по п. 15, где CAR экспрессируется и связывается с ВСМА на клетках множественной миеломы, и клетки множественной миеломы разрушаются.
19. Способ разрушения клеток множественной миеломы, который включает контактирование клеток множественной миеломы, экспрессирующих ВСМА, с одной или более чем одной из выделенных NK-клеток по п. 16, где CAR экспрессируется и связывается с ВСМА на клетках множественной миеломы, и клетки множественной миеломы разрушаются.
20. Способ по п.18 или п.19, где клетки множественной миеломы являются человеческими.
21. Применение CAR по любому из пп. 1-7 при производстве лекарственного средства для разрушения раковых клеток.
22. Применение выделенной нуклеиновой кислоты по п. 8 при производстве лекарственного средства для разрушения раковых клеток.
23. Применение экспрессионного вектора по любому из пп. 9-11 при производстве лекарственного средства для разрушения раковых клеток.
24. Применение выделенной клетки по любому из пп. 12-15 при производстве лекарственного средства для разрушения раковых клеток.
25. Применение композиции по п. 16 при производстве лекарственного средства для разрушения раковых клеток.
26. Применение по любому из пп. 21-25, где раковые клетки представляют собой клетки множественной миеломы или клетки лимфомы Ходжкина.

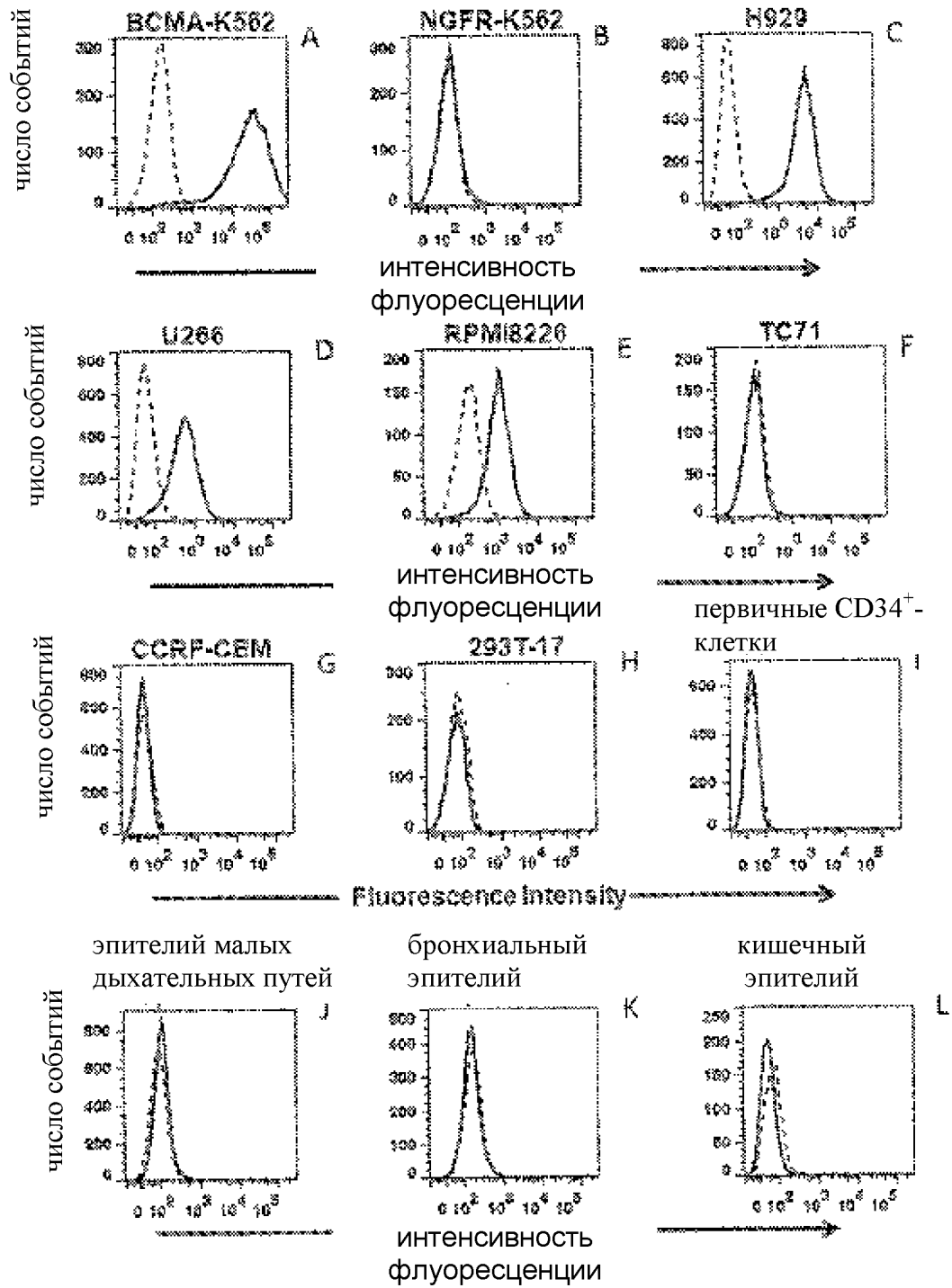
Фиг. 1А



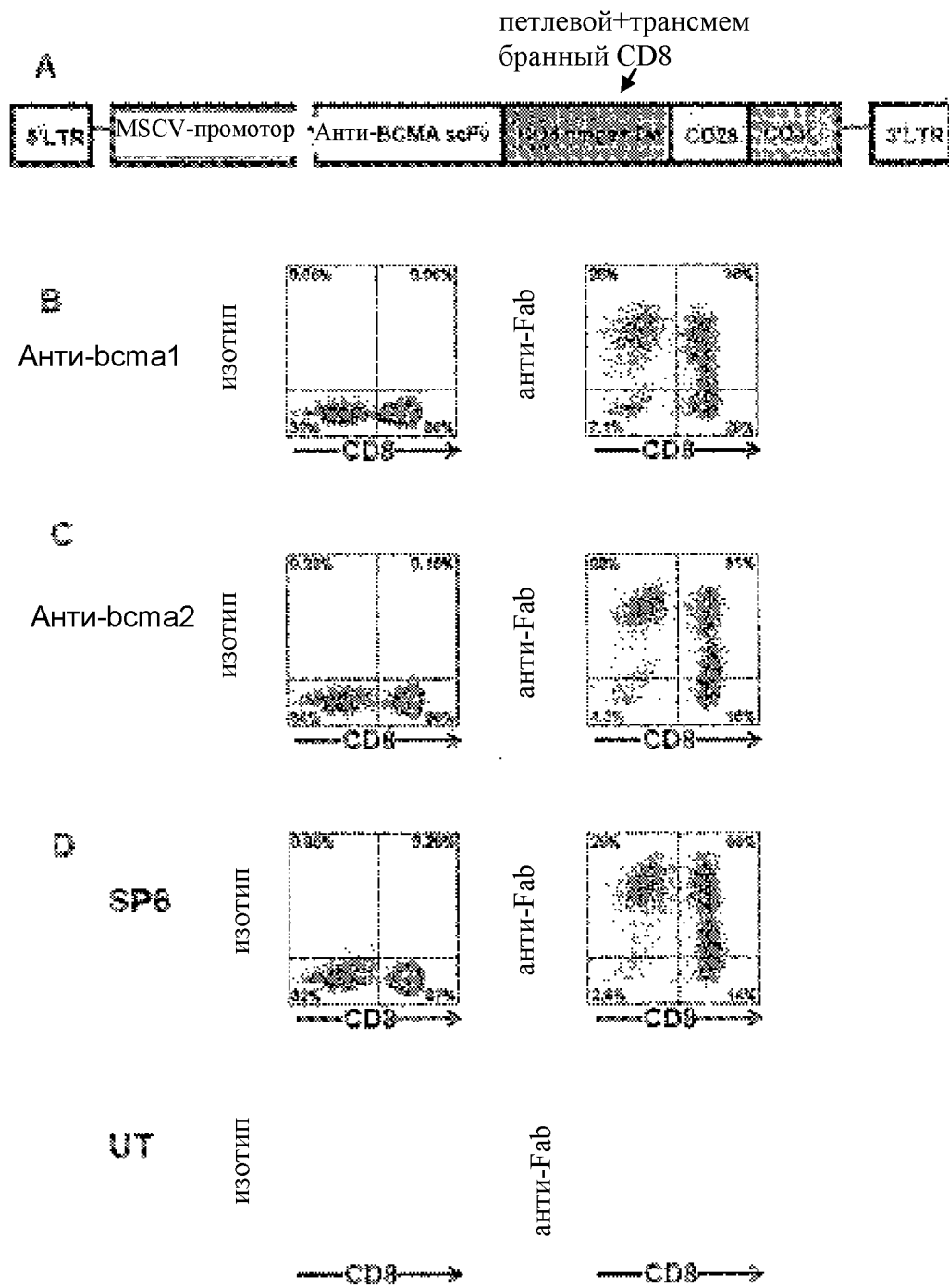
Фиг. 1В



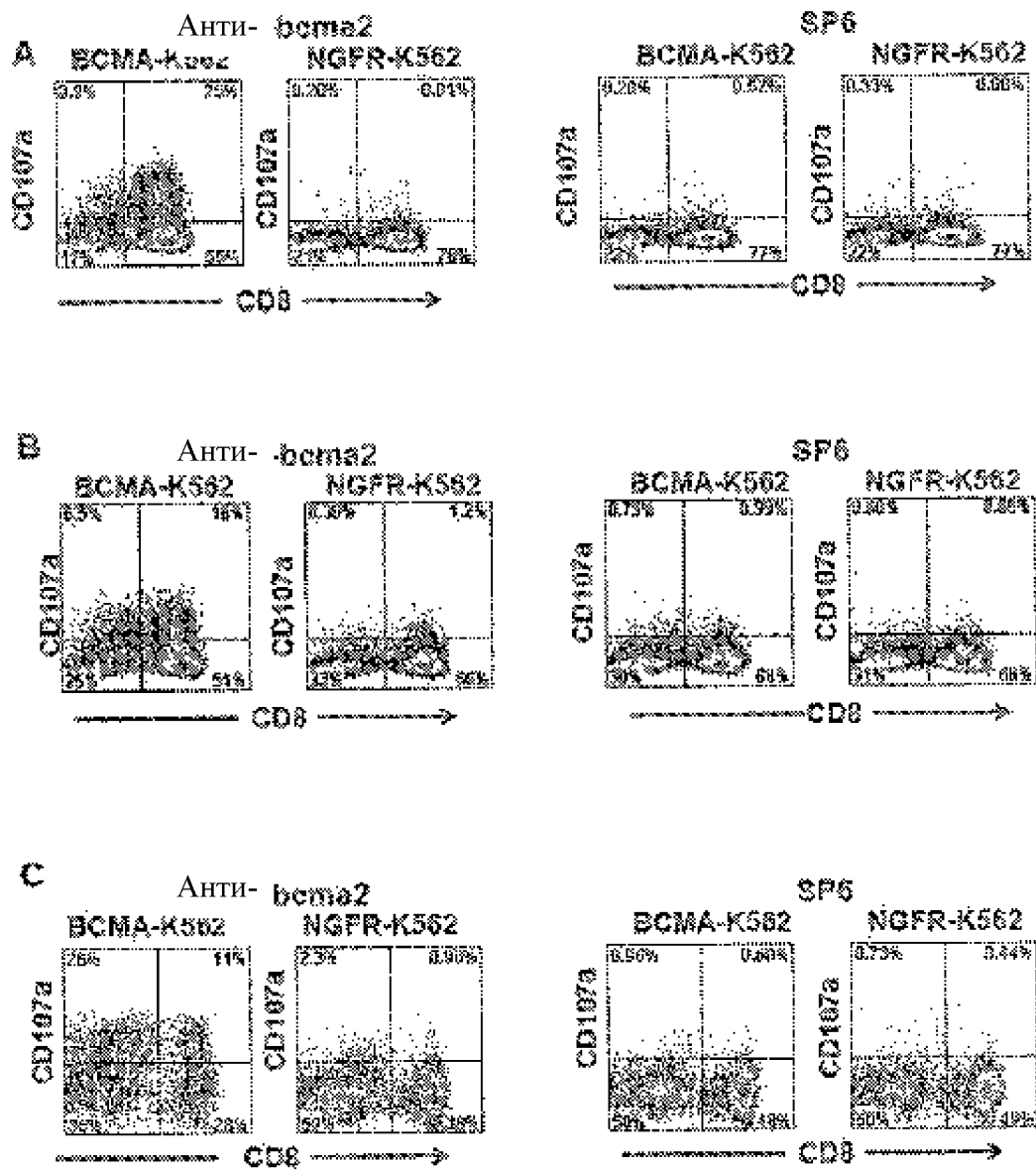
Фиг. 2



Фиг. 3

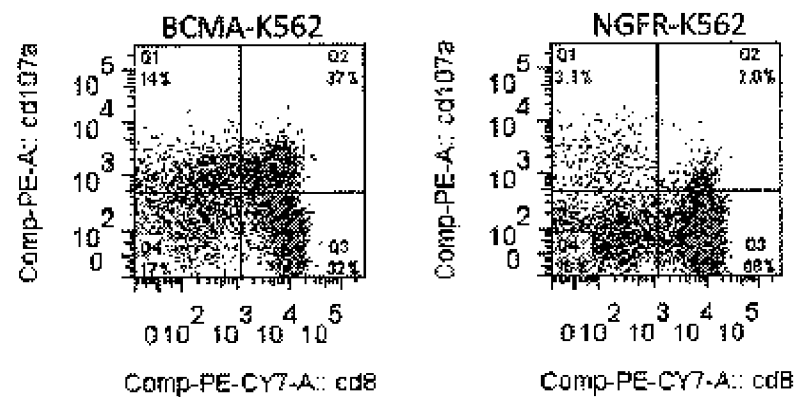


Фиг. 4



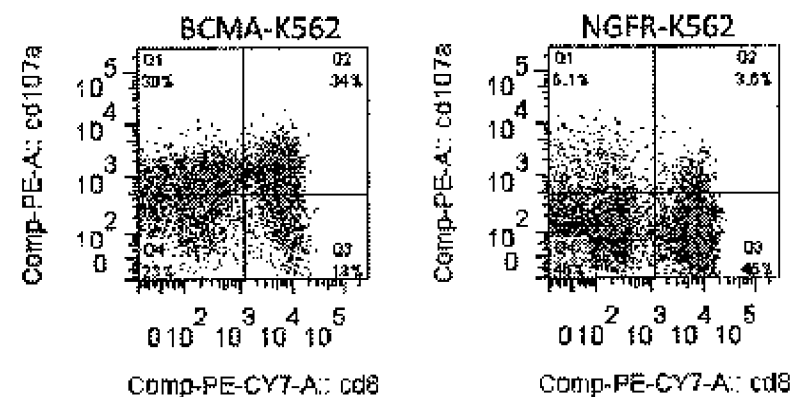
Фиг. 5А

Анти--bcma2-OX40



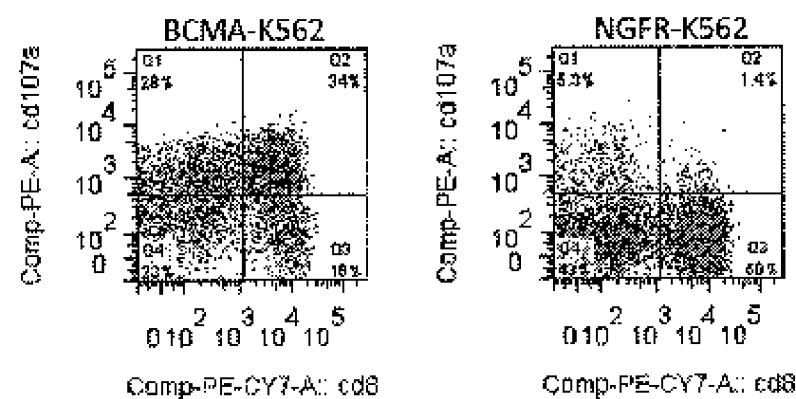
Фиг. 5В

Анти--bcma2-BB



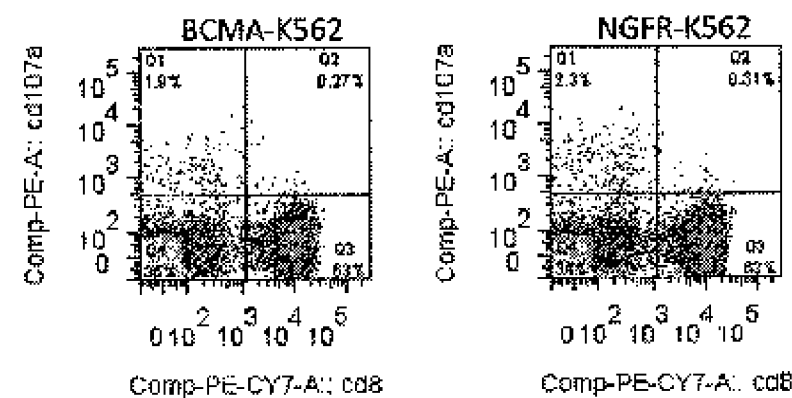
Фиг. 5С

8ss-Анти-bcma2



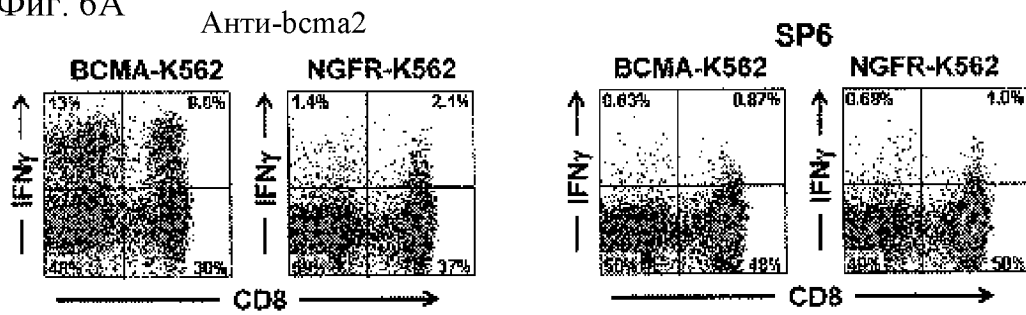
Фиг. 5D

нетрансдуцированные

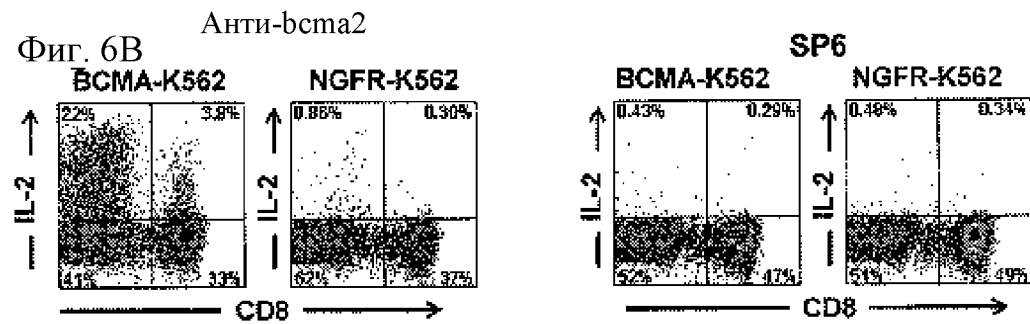


Фиг. 6

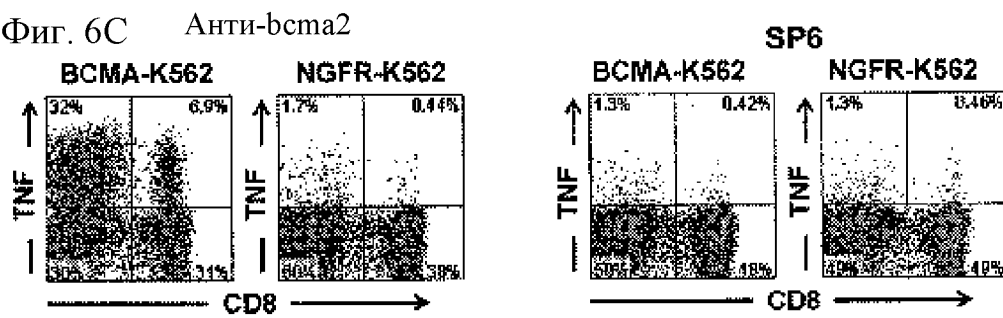
Фиг. 6А



Фиг. 6В

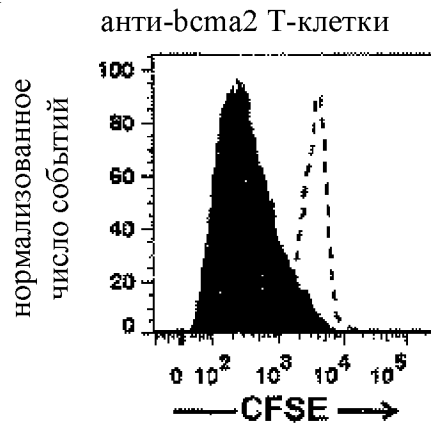


Фиг. 6С

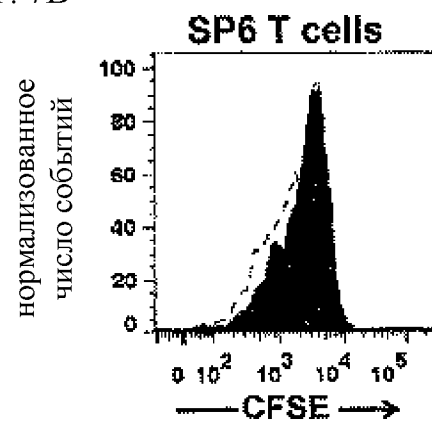


Фиг. 7

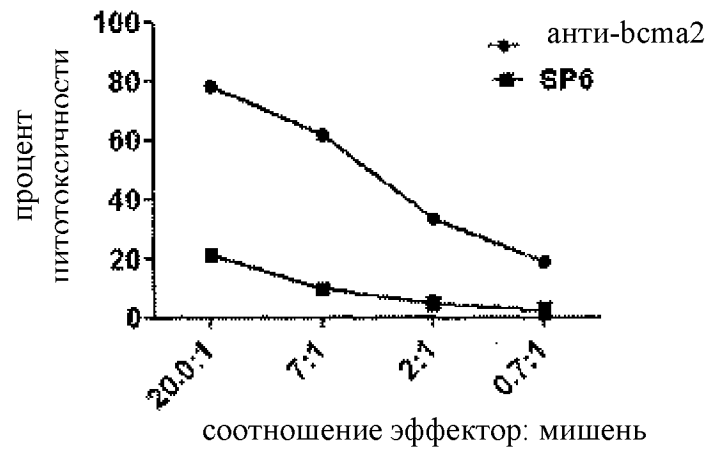
Фиг. 7А



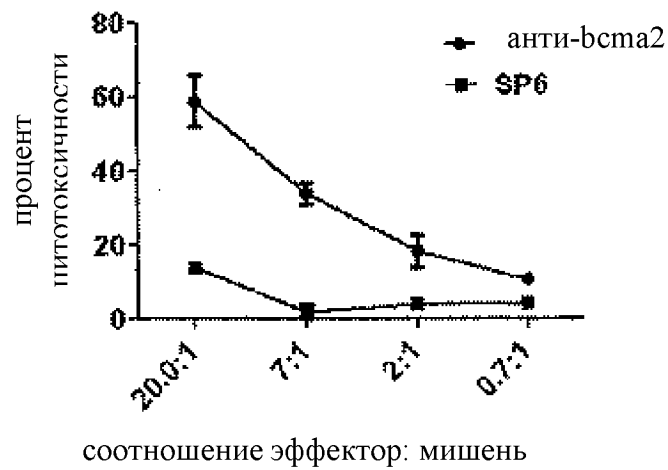
Фиг. 7В



Фиг. 7С

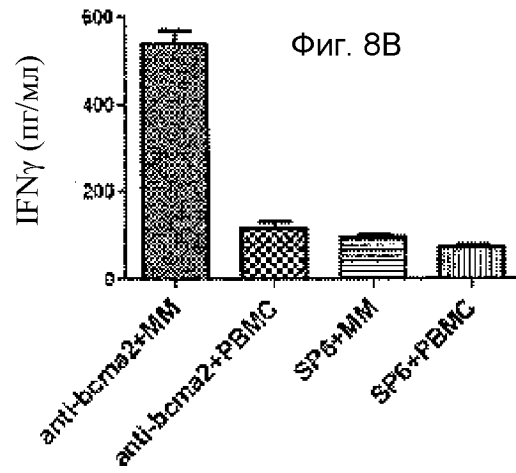


Фиг. 7D

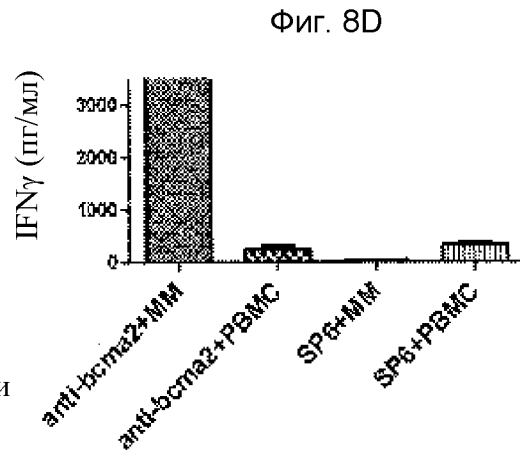
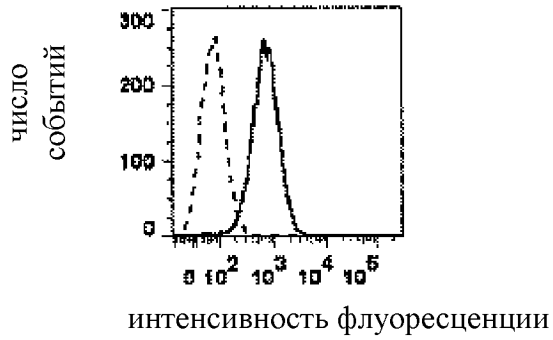


Фиг. 8

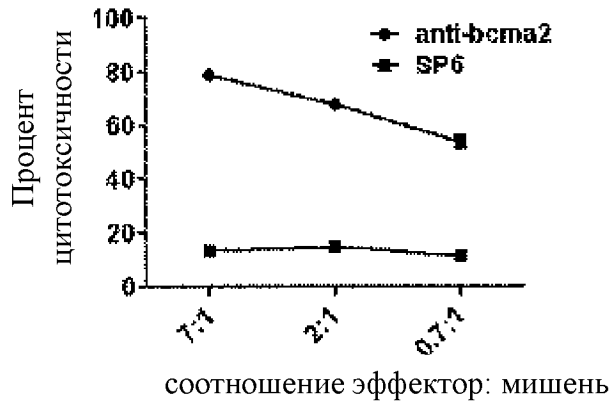
Фиг. 8A



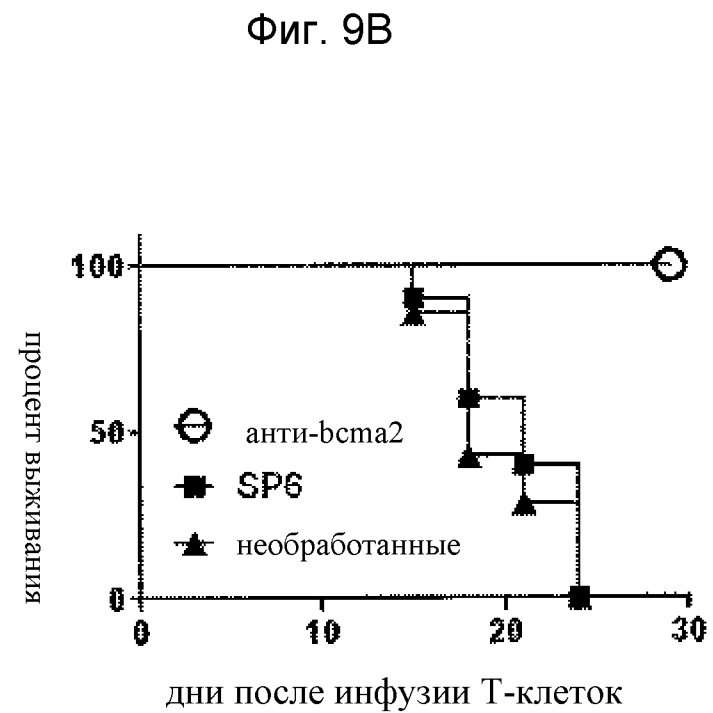
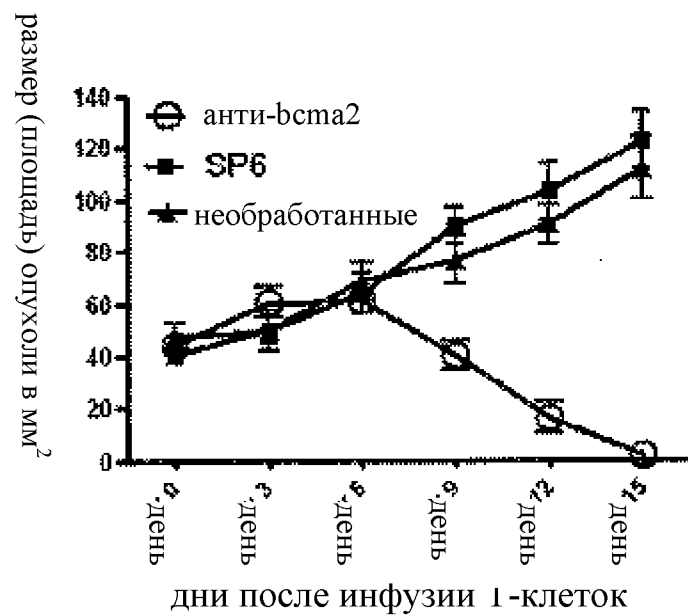
Фиг. 8C



Фиг. 8E



anti=анти



Фиг. 9

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ
ПОИСКЕ(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)Номер евразийской заявки:
201990959

Дата подачи: 15 марта 2013 (15.03.2013) Дата испрашиваемого приоритета: 11 апреля 2012 (11.04.2012)

Название изобретения: Химерные антигенные рецепторы, нацеленные на антиген созревания В-клеток

Заявитель: ДЗЕ ЮНАЙТЕД СТЕЙТС ОФ АМЕРИКА, ЭЗ РЕПРЕЗЕНТЕД БАЙ ДЗЕ СЕКРЕТАРИ,
ДЕПАРТМЕНТ ОФ ХЕЛС ЭНД ХЬЮМАН СЕРВИСЕЗ☐ Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)☐ Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

МПК:

см. дополнит.лист

СПК:

см. дополнит.лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)

C07K 14/705, 14/725, 16/18, 16/28, C12N 15/62, A61K 39/00, 48/00, A61P 35/00

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2010/104949 A2 (BIOGEN IDEC MA INC. et al.) 16.09.2010, реферат, формула	1-26
A	WO 2011/041093 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES et al.) 07.04.2011, реферат, формула	1-26
A	CH'EN Paul F.-T. et al. Characterisation of monoclonal antibodies to the TNF and TNF receptor families. Cellular Immunology, 2005, vol. 236, pp. 78-85, реферат	1-26

☐ последующие документы указаны в продолжении графы В☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

"А" документ, определяющий общий уровень техники

"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета

"D" документ, приведенный в евразийской заявке

"Т" более поздний документ, опубликованный после даты

приоритета и приведенный для понимания изобретения

"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

"&" документ, являющийся патентом-аналогом

"L" документ, приведенный в других целях

Дата действительного завершения патентного поиска: 25 ноября 2019 (25.11.2019)

Наименование и адрес Международного поискового органа:

Федеральный институт

промышленной собственности

РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб.,

д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо:

А.Н. Банченко

Телефон № (499) 240-25-91

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

Номер евразийской заявки:
201990959

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

МПК:

C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

СПК:

C07K 14/70503 (2013-01)
C07K 14/77051 (2013-01)
C07K 14/70517 (2013-01)
C07K 14/70521 (2013-01)
C07K 16/18 (2013-01)
C07K 16/2878 (2013-01)
C12N 15/62 (2013-01)
A61K 39/00 (2017-08)
A61K 48/00 (2013-01)
A61P 35/00 (2018-01)