

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290375** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.04.12

(22) Дата подачи заявки
2020.07.24

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

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

(31) 62/878,125; 63/020,177; 63/021,407

(32) 2019.07.24; 2020.05.05; 2020.05.07

(33) US

(86) PCT/US2020/043567

(87) WO 2021/016585 2021.01.28

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Брей Кевин, Дельфино Фрэнк,

Дайлилло Дэвид, Михер Томас Крейг

(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) MAGE-A4, или ассоциированный с меланомой антиген A4, представляет собой раково-тестикулярный антиген (CTA) на X-хромосоме. В настоящем изобретении предложены специфические для MAGE-A4 химерные антигенные рецепторы и клетки, экспрессирующие такие химерные антигенные рецепторы. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы согласно настоящему изобретению, способны ингибировать рост опухолей, экспрессирующих MAGE-A4. Сконструированные клетки по настоящему изобретению применимы для лечения заболеваний и нарушений, при которых желателен и/или терапевтически полезен усиленный или индуцированный нацеленный на MAGE-A4 иммунный ответ. Например, сконструированные клетки, экспрессирующие специфические для MAGE-A4 химерные антигенные рецепторы по настоящему изобретению, полезны для лечения различных злокачественных новообразований.

A1

202290375

202290375

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572778EA/042

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

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] В настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США №№ 62/878125, поданной 24 июля 2019 г.; 63/020177, подана 5 мая 2020 г.; и 63/021407, поданной 7 мая 2020 г., каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки для всех целей.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] В настоящую заявку посредством ссылки включен «Перечень последовательностей», поданный в машиночитаемой форме в виде файла 10600WO01-Sequence.txt, созданного 24 июля 2020 года, размером 123650 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

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

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

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

[0005] MAGE-A4 широко экспрессируется многими опухолями различных гистологических типов, такими как плоскоклеточный рак головы и шеи, карцинома легкого, например немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак пищевода, рак толстой кишки, рак мочевого пузыря, мукозальные и кожные меланомы, карцинома яичников, такая как серозная карцинома, и карцинома матки, но в нормальных здоровых тканях взрослого человека экспрессия MAGE-A4 ограничена семенниками.

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

[0007] Адоптивная иммунотерапия, которая включает перенос аутологичных антигенспецифических Т-клеток, полученных ex vivo, является многообещающей стратегией лечения вирусных инфекций и злокачественного новообразования. Т-клетки, используемые для адоптивной иммунотерапии, могут быть получены либо путем экспансии антигенспецифических Т-клеток, либо перенаправления Т-клеток с помощью генной инженерии. **[0008]** Новые специфичности Т-клеток были успешно получены

посредством генетического переноса рецепторов трансгенных Т-клеток или химерных антигенных рецепторов (CAR) (Jena, Dotti et al. 2010). CAR представляют собой синтетические рецепторы, состоящие из нацеленного фрагмента, который связан с одним или более сигнальными доменами в одной слитой молекуле. Как правило, связывающий фрагмент CAR состоит из антигенсвязывающего домена одноцепочечного антитела (scFv), содержащего переменные фрагменты легкой и тяжелой цепей моноклонального антитела, соединенные гибким линкером. Сигнальные домены для CAR первого поколения получают из цитоплазматической области CD3-дзета или гамма-цепей Fc-рецептора. Было показано, что CAR первого поколения успешно перенаправляют цитотоксичность Т-клеток. Однако они не смогли обеспечить длительную экспансию и противоопухолевую активность *in vivo*. Для получения CAR второго и третьего поколений были добавлены сигнальные домены костимулирующих молекул, а также трансмембранные и шарнирные домены, что привело к некоторым успешным терапевтическим исследованиям с участием людей. Например, CAR-перенаправленные Т-клетки, специфичные для дифференцировочного антигена В-клеток CD19, показали впечатляющую эффективность при лечении В-клеточных злокачественных новообразований, в то время как TCR-перенаправленные Т-клетки продемонстрировали преимущества у пациентов, имеющих солидное злокачественное новообразование. Stauss et al. описывают стратегии модификации терапевтических CAR и TCR для применения при лечении злокачественного новообразования, например, для усиления антигенспецифической эффекторной функции и ограничения токсичности сконструированных Т-клеток (Current Opinion in Pharmacology 2015, 24:113-118).

[0009] Существует неудовлетворенная потребность в новых нацеленных агентах на основе CAR, которые специфически связываются с антигенами MAGE-A4, а также в способах получения и применения таких агентов в терапевтических и диагностических целях.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] В настоящем изобретении представлены химерные антигенные рецепторы (CAR), которые были созданы против пептидного антигена MAGE-A4 в контексте МНС (HLA-A2). В некоторых вариантах осуществления последовательности CAR обладают специфическим связыванием с небольшим пептидом MAGE-A4 286-294 или MAGE-A4 230-239, презентруемым HLA-A2.

[0011] В соответствии с аспектом в настоящем изобретении представлен химерный антигенный рецептор (CAR), специфический для ассоциированного с меланомой антигена A4 (MAGE-A4), при этом указанный химерный антигенный рецептор, специфический для MAGE-A4, взаимодействует с аминокислотами 286-294 или 230-239, или его частью, SEQ ID NO: 32, и при этом указанный специфичный для MAGE-A4 CAR специфически связывается с HLA-связанным полипептидом MAGE-A4. В некоторых вариантах осуществления Специфический для MAGE-A4 CAR включает от N-конца к C-концу: (а) внеклеточный лиганд-связывающий домен, содержащий антигенсвязывающий домен к

MAGE-A4; (b) шарнир; (c) трансмембранный домен; и (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен и сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный лиганд-связывающий домен содержит домен переменного фрагмента одноцепочечной цепи (scFv) к MAGE-A4, содержащий переменную область легкой цепи (LCVR) и переменную область тяжелой цепи (HCVR). В некоторых вариантах осуществления домен scFv к MAGE-A4 содержит первый линкер между LCVR и HCVR. В некоторых вариантах осуществления специфический для MAGE-A4 CAR дополнительно содержит второй линкер между внеклеточным лиганд-связывающим доменом и шарниром. В некоторых вариантах осуществления первый линкер и второй линкер содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-26. В некоторых вариантах осуществления первый линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, а второй линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

[0012] В некоторых вариантах осуществления шарнир, трансмембранный домен или оба домена специфического для MAGE-A4 CAR получают из полипептида CD8 α . В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен включает костимулирующий домен 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления шарнир, трансмембранный домен или оба получают из полипептида CD28. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен включает костимулирующий домен CD28. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления LCVR содержит определяющие комплементарность области (CDR) LCVR, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления LCVR содержит LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12-14-16, соответственно. В некоторых вариантах осуществления HCVR содержит CDR HCVR, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления HCVR содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4-6-8, соответственно.

[0013] В некоторых вариантах осуществления специфический для MAGE-A4 CAR содержит LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 37, или аминокислотную последовательность, имеющую 95-99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 37; и HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, имеющую 95-99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 37, а HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления LCVR содержит определяющие комплементарность

области (CDR) LCVR, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления LCVR содержит LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 61-63-65, соответственно. В некоторых вариантах осуществления HCVR содержит CDR HCVR, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления HCVR содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53-55-57, соответственно. В некоторых вариантах осуществления специфический для MAGE-A4 CAR содержит LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 или аминокислотную последовательность, имеющую 95-99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 59; и HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 или аминокислотную последовательность, имеющую 95--99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, а HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления шарнир содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления шарнир содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления специфический для MAGE-A4 CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления специфический для MAGE-A4 CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления специфический для MAGE-A4 CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор специфически связывается с одной или более аминокислотами в положениях 286-294 SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления специфический для MAGE-A4 CAR специфически связывается с одной или более аминокислотами в положениях 230-239 SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления HLA представляет собой HLA-A2.

[0014] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую специфический для MAGE-A4 CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 72. В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает вектор, содержащий описанную в данном документе молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой ДНК-вектор, РНК-вектор, плазмиду, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой лентивирусный вектор.

[0015] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает клетку, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, или вектор, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой человеческую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит химерный антигенный рецептор, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой иммунную клетку, такую как иммунная эффекторная клетка или Т-лимфоцит (например, воспалительный Т-лимфоцит, цитотоксический Т-лимфоцит, регуляторный Т-лимфоцит или Т-хелпер). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой CD8⁺ цитотоксический Т-лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка предназначена для лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4, такого как множественная миелома или меланома.

[0016] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает сконструированную человеческую Т-клетку, содержащую химерный антигенный рецептор, содержащий от N-конца до C-конца: (а) внеклеточный лиганд-связывающий домен, содержащий домен одноцепочечный вариабельный фрагмент к MAGE-A4 (scFv), содержащий вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR); (b) шарнир; (c) трансмембранный домен; и (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен 4-1BB или костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления scFv к MAGE-A4 специфически связывается с одним или более аминокислотными остатками в положениях 286-294 SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые содержат аминокислотные

последовательности SEQ ID NO: 2/10. В некоторых вариантах осуществления домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2/37. В некоторых вариантах осуществления домен scFv специфически связывается с одним или более аминокислотными остатками в положениях 230-239 SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51/59. В некоторых вариантах осуществления шарнир содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления шарнир содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления сконструированная человеческая Т-клетка содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления сконструированная человеческая Т-клетка содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления сконструированная человеческая Т-клетка содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления сконструированная человеческая Т-клетка содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления сконструированная человеческая Т-клетка содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

[0017] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую генетически модифицированную Т-клетку человека и фармацевтически приемлемый носитель, при этом генетически модифицированная человеческая Т-клетка содержит химерный антигенный рецептор, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит сконструированную клетку или сконструированную человеческую Т-клетку, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция предназначена для лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4, такого как множественная миелома или меланома.

[0018] В аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение химерного антигенного рецептора, как описано в данном документе, молекулы нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, вектора, как описано в данном документе, клетки, как описано в данном документе, сконструированной клетки, как описано в данном документе, или сконструированной Т-клетки человека, как описано в данном документе, в производстве лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4, такого как множественная миелома или меланома.

[0019] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ повышения активности Т-лимфоцитов у субъекта, включающий введение субъекту Т-лимфоцита, содержащего химерный антигенный рецептор, как описано в данном документе. В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения субъекта, имеющего злокачественное новообразование, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества Т-лимфоцита, содержащего химерный антигенный рецептор, как описано в данном документе. В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа на целевую популяцию клеток или ткань у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии химерного антигенного рецептора, как описано в данном документе. В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии химерного антигенного рецептора, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет множественную миелому, синовиальную саркому, рак пищевода, рак головы и шеи, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак матки, рак желудка, рак шейки матки, рак молочной железы или меланому. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет множественную миелому.

[0020] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ конструирования популяции клеток для экспрессии химерного антигенного рецептора, включающий: (а) введение в популяцию иммунных клеток молекул нуклеиновых кислот, кодирующих химерный антигенный рецептор, как описано в данном документе; (b) культивирование указанной популяции иммунных клеток в условиях, подходящих для экспрессии указанных молекул нуклеиновой кислоты; и (с) выделение указанных иммунных клеток, экспрессирующих указанный химерный антигенный рецептор на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает получение указанной популяции иммунных клеток от субъекта до введения указанной молекулы нуклеиновой кислоты.

[0021] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4, у субъекта,

включающий: (a) конструирование популяции клеток, как описано в данном документе; и (b) повторное введение указанному субъекту указанной популяции клеток, экспрессирующих указанный химерный антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления указанное злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой множественную миелому.

[0022] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает выделенный антигенсвязывающий белок, который конкурирует за связывание со специфическим для MAGE-A4 CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенный антигенсвязывающий белок представляет собой CAR. В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает выделенный антигенсвязывающий белок, который связывается с тем же эпитопом, что и специфический для MAGE-A4 CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенный антигенсвязывающий белок представляет собой CAR.

[0023] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает выделенное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с полипептидом ассоциированного с меланомой антигена A4 (MAGE-A4), где антитело имеет одну или более из следующих характеристик: (a) связывается с полипептидом MAGE-A4 с EC50 менее около 10^{-9} M; (b) демонстрирует увеличение выживаемости у животного со злокачественным новообразованием после введения указанному животному по сравнению с сопоставимым животным без указанного введения; и/или (c) включает (i) три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с HCVR, приведенной в Таблице 1; и (ii) три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с LCVR, приведенной в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления полипептид MAGE-A4 представляет собой полипептид MAGE-A4, связанный с HLA-A2.

[0024] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых случаях выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2/10. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51. В

некоторых случаях выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2/37.

[0025] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий: (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; (e) домен LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0026] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59.

[0027] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий: (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53; (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; (e) домен LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

[0028] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 51/59.

[0029] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG1. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG4. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело.

[0030] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как обсуждалось выше или в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит второй терапевтический агент. В некоторых случаях второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из противоопухолевого агента, стероидов и нацеленных терапевтических средств.

[0031] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает полинуклеотидную молекулу, содержащую полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR или LCVR антитела, как описано выше или в данном документе.

[0032] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает вектор, содержащий полинуклеотид, обсуждаемый выше.

[0033] В одном аспекте настоящее изобретения обеспечивает клетку, содержащую вектор, описанный выше.

[0034] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4, при этом способ включает введение субъекту антитела или антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции, как описано выше или в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом. В некоторых случаях второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из противоопухолевого агента, стероидов и нацеленных терапевтических средств. Применение антител, их антигенсвязывающих фрагментов и фармацевтических композиций для лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4, или в производстве лекарственного препарата для лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4, также входит в объем настоящего изобретения.

[0035] Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0036] На **Фиг. 1** показана иллюстративная нуклеотидная конструкция для экспрессии конструкции химерного антигенного рецептора (CAR). Иллюстративная нуклеотидная конструкция включает scFv VL-линкер-VH к MAGE-A4, шарнир и трансмембранный домен CD8 человека, костимулирующий домен 4-1BB, сигнальный домен CD3-дзета и последовательность IRES:eGFP для отслеживания CAR трансдуцированных клеток.

[0037] **Фиг. 2А и Фиг. 2В:** на **Фиг. 2А** представлены данные цитотоксичности *in vitro*, демонстрирующие, что CAR-T-клетки, нацеленные на HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄, проявляют повышенную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток меланомы человека A375 (незакрашенные черные кружки, пунктирная линия) и клеток A375, сверхэкспрессирующих HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ (закрашенные черные кружки, сплошная линия, обозначены как A375++) по сравнению с контрольными Т-клетками с CAR против клеток A375 (A375 и A375++ можно увидеть как две верхние кривые). На **Фиг. 2В** представлены данные цитотоксичности *in vitro*, демонстрирующие, что CAR-T-клетки, нацеленные на HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄, проявляют повышенную цитотоксичность в отношении клеток множественной миеломы IM9 (незакрашенные черные кружки, пунктирная линия) и целевых клеток IM9, сверхэкспрессирующих HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄, (закрашенные черные кружки, сплошная линия, обозначены как IM9++), по сравнению с контрольными CAR Т-клетками против клеток A375 (IM9 и IM9++ можно увидеть как две верхние кривые).

[0038] **Фиг. 3А и Фиг. 3В:** на **Фиг. 3А** показан объем опухоли в зависимости от

времени у мышей с ксенотрансплантатом опухолевых клеток меланомы человека HLA-A2⁺MAGE-A4⁺ A375, получавших контрольные CAR Т-клетки (Т-клетки с CAR к HLA-A2/ PV16E7(11-19)). Из пяти исследуемых мышей к концу исследования ни у одной не было опухоли (животные были умерщвлены на 42-й день). На Фиг. 3В показан объем опухоли в зависимости от времени у мышей с ксенотрансплантатом опухолевых клеток меланомы человека HLA-A2⁺MAGE-A4⁺ A375, получавших лечение Т-клетками с CAR к HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄. К концу исследования (55 день) все пять исследуемых мышей не имели опухолей.

[0039] Фиг. 4А и Фиг. 4В: на Фиг. 4А показан объем опухоли в зависимости от времени у мышей с ксенотрансплантатом опухолевых клеток множественной миеломы человека HLA-A2⁺MAGE-A4⁺ IM9, получавших лечение контрольными CAR Т-клетками (Т-клетки с CAR к HLA-A2/HPV16E7(11-19)). Из пяти исследуемых мышей к концу исследования ни у одной не было опухоли (животные были умерщвлены на 29-й день). На Фиг. 4В показан объем опухоли в зависимости от времени у мышей с ксенотрансплантатом опухолевых клеток множественной миеломы человека HLA-A2⁺MAGE-A4⁺ IM9, получавших лечение Т-клетками с CAR к HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄. Из пяти исследуемых мышей у трех не было опухоли к концу исследования (52 день).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0040] Следует понимать, что описанные в данном документе изобретения не ограничиваются конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не является ограничивающей, так как объем настоящих изобретений ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты осуществления или признаки вариантов осуществления могут быть объединены друг с другом, и такие комбинации явно входят в объем настоящего изобретения. Любое конкретное значение, указанное выше или далее в данном документе, можно комбинировать с другим связанным значением, указанным выше или далее в настоящем документе, для приведения диапазона, в котором указанные значения представляют собой верхний и нижний пределы диапазона, и такие диапазоны включены в объем настоящего изобретения.

[0041] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относятся изобретения. Используемый в данном документе термин «около» при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, в данном документе выражение «около 100» включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.).

[0042] Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут использоваться при практическом

осуществлении или испытании настоящих изобретений, предпочтительные способы и материалы описаны далее. Содержание всех патентов, заявок и непатентных публикаций, упомянутых в настоящем описании, включено в настоящий документ во всей полноте посредством ссылок.

Определения

[0043] Используемый в данном документе термин «MAGE-A4» относится к ассоциированному с меланомой антигену A4. MAGE-A4 представляет собой внутриклеточный белок, экспрессируемый множеством различных опухолевых клеток. Используемый в данном документе термин «MAGE-A4» относится к белку MAGE-A4 человека, если не указано, что он принадлежит к отличным от человека видам (например, «MAGE-A4 мыши», «MAGE-A4 обезьяны» и т. д.). Белок MAGE-A4 человека имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32, и последовательность полинуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 31. Ссылки на конкретные области полипептида MAGE-A4 (например, MAGE-A4 286-294 или MAGE-A4 230-239) относятся к SEQ ID NO: 32. Используемые в данном документе термины «MAGE-A4 286-294», «MAGE-A4 (286-294)» и «MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄» могут использоваться взаимозаменяемо. Аналогичным образом, термины «MAGE-A4 230-239», «MAGE-A4 (230-239)» и «MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉» могут использоваться взаимозаменяемо. Полипептидная последовательность MAGE-A4 (286-294) (KVLEHVVRV) представлена как SEQ ID NO: 33. Полипептидная последовательность MAGE-A4 (230-239) (GVYDGRENTV) представлена как SEQ ID NO: 49.

[0044] Используемый в данном документе термин «антитело, связывающее MAGE-A4» или «антитело к MAGE-A4» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают MAGE-A4. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывает MAGE-A4, взаимодействует с аминокислотами 286-294 MAGE-A4 или аминокислотами 230-239 MAGE-A4.

[0045] Термины «лиганд-связывающий домен» и «антигенсвязывающий домен» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к той части химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела, которое специфически связывается с заранее определенным антигеном (например, MAGE-A4). Ссылки на «соответствующее антитело» относятся к антителу, из которого получены CDR или переменные области (переменная область тяжелой цепи (сокращенно HCVR или VH) и переменная область легкой цепи (сокращенно LCVR или VL)), используемые в химерном антигенном рецепторе. Например, конструкции химерного антигенного рецептора, обсуждаемые в Примерах, включают scFv с переменными областями, полученными из антитела к MAGE-A4. Это антитело к MAGE-A4 является «соответствующим антителом» в отношении соответствующего химерного антигенного рецептора.

[0046] Термин «антитело» в контексте настоящего документа означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей

мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфично связывается или взаимодействует с определенным антигеном (например, MAGE-A4). В некоторых вариантах осуществления антитело может связываться или взаимодействовать с МНС-связанным полипептидом, таким как HLA-связанный полипептид. В контексте настоящего раскрытия, в некоторых вариантах реализации антитело может связываться с HLA-A2-связанным полипептидом, таким как полипептид MAGE-A4 (например, MAGE-A4 286-294 или 230-239), презентированный HLA-A2. Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидных цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Термин «антитело» также включает молекулы иммуноглобулина, состоящие из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь (сокращенно обозначаемая в данном документе как HC) содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Каждая легкая цепь (сокращенно обозначаемая в данном документе как LC) содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца до C-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения, FR антитела к MAGE-A4 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть природно или искусственно модифицированы. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе сравнительного анализа двух или более CDR.

[0047] Термин «антитело», в контексте данного документа, также включает в себя антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п. в контексте настоящего документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически модифицированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генной инженерии, включающие обработку и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антител. Такая ДНК известна и/или легко доступна из, например, коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые

библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с помощью методик молекулярной биологии, например, для размещения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, присоединения или удаления аминокислот и т. д.

[0048] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), например, пептид CDR3), или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также охватываются выражением «антигенсвязывающий фрагмент», в контексте данного документа.

[0049] Антигенсвязывающий фрагмент антитела в типичном случае содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая прилегает к одной или более каркасным последовательностям или находится в рамке считывания с ними. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H, ассоциированный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут быть расположены друг относительно друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L.

[0050] В отдельных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по данному изобретению, включают: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; и (xiv) V_L-C_L. В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любой из иллюстративных конфигураций, приведенных выше, переменные и константные домены могут быть непосредственно связаны друг с другом или могут быть связаны с помощью полноразмерного или частичного шарнирного или линкерного участка. Шарнирный участок может состоять по

меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по данному описанию может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или более мономерными V_H - или V_L -доменами (например, с помощью дисульфидной(-ых) связи(-ей)).

[0051] В некоторых вариантах осуществления антитела к MAGE-A4, из которых получены антигенсвязывающие фрагменты, являются человеческими антителами. Термин «антитело человека», в контексте данного документа, предполагает включение в себя антител, имеющих переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела по настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, вводимые с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако, термин «антитело человека», в контексте данного документа, не предполагает включение антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь, были встроены в каркасные последовательности человека.

[0052] Антитела, используемые для создания антигенсвязывающих фрагментов к MAGE-A4, в некоторых вариантах осуществления могут быть рекомбинантными человеческими антителами. В контексте данного документа термин «рекомбинантное антитело человека» предназначен для включения всех антител человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, например, антител, экспрессируемых с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описано дополнительно ниже), антител, выделенных из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека (описано дополнительно ниже), антител, выделенных из организма животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al., 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг генных последовательностей иммуноглобулина человека в другие последовательности ДНК. Указанные рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, выделенные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. В определенных вариантах осуществления, тем не менее, указанные рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, в случае использования трансгенных животных, имеющих последовательности Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом,

аминокислотные последовательности областей V_H и V_L в рекомбинантных антителах представляют собой последовательности, которые хотя и выделены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и родственных им, в естественных условиях могут не существовать в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

[0053] Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с различиями шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию массой приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, и образуется молекула массой приблизительно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

[0054] Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена, не ограничиваясь перечисленным, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области человеческого IgG4 может значительно уменьшить частоту появления второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнира человеческого IgG1. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнирной области, C_H2 или C_H3 области, которые могут быть желательны, например, при производстве, для улучшения выхода желаемой формы антитела.

[0055] Антитела могут представлять собой выделенные антитела. «Выделенное антитело» в контексте данного документа означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено по меньшей мере из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которой антитело существует в природе или продуцируется естественным путем, является «выделенным антителом» для целей данного описания. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с определенными вариантами осуществления выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

[0056] Описанные в данном документе антитела к MAGE-A4 или их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения раскрытых в данном документе аминокислотных

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

[0057] Антитела к MAGE-A4 могут содержать варианты любой из описанных в

данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или более консервативных замен. Например, антитела к MAGE-A4 могут иметь аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 9 или меньше, 8 или меньше, 7 или меньше, 6 или меньше, 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше, или 1 консервативной аминокислотной заменой относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, указанных в данном документе.

[0058] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с определенным антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические действия. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован сближенными в пространстве аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образованный смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

[0059] Термин «по существу идентичность» или «по существу идентичный» применительно к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту означает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) имеет место идентичность нуклеотидных оснований нуклеотидной последовательности, которая составляет по меньшей мере приблизительно 95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%, при измерении с помощью любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, по существу идентичная эталонной молекуле нуклеиновой кислоты, в определенных случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый указанной эталонной молекулой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает полипептид, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере

мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 39, или части SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 39 (например, HCVR, такая как последовательность SEQ ID NO: 2, или LCVR, такая как последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 37, или каркасная область полипептидной последовательности, например, такая, которая присутствует в SEQ ID NO: 2, 10, 22, 37 или 39). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает полинуклеиновую кислоту, кодирующую такой полипептид. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает полинуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 38, или части SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 38 (например, HCVR, такая как последовательность SEQ ID NO: 1, или LCVR, такая как последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 36, или каркасная область полипептидной последовательности, например, такая, которая присутствует в SEQ ID NO: 1, 9, 21, 36 или 38).

[0060] Применительно к полипептидам термин «по существу сходство» или «по существу схожий» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, обладают по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой такую, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена существенно не изменит функциональных свойств белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности или степень сходства последовательностей могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы внести поправку на консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенный в

данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со схожими химическими свойствами, включают: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидосодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в источнике Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, включенном в данный документ посредством ссылки. «Умеренно консервативной» заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[0061] Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков подбирает схожие последовательности, применяя показатели сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут быть использованы с параметрами по умолчанию для определения гомологии или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать, используя FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой и искомой последовательностями (Pearson (2000) выше). Последовательности также можно сравнивать с использованием алгоритма поиска гомологии Смита - Уотермана, используя аффинный поиск гэпов со штрафом за открытие гэпа 12 и штрафом за продление гэпа 2, матрицу BLOSUM 62. Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, источники Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

[0062] В контексте настоящего изобретения термины «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотиды» относятся к нуклеотидам и/или полинуклеотидам, таким как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) или рибонуклеиновая кислота (РНК), олигонуклеотидам, фрагментам, полученным в результате полимеразной цепной реакции (ПЦР), и фрагменты, образованные в результате лигирования, расщепления, эндонуклеазного или экзонуклеазного действия. Молекулы нуклеиновых кислот могут состоять из мономеров, которые являются природными нуклеотидами (такими как ДНК и РНК), или аналогами природных нуклеотидов (например, энантиомерные формы природных нуклеотидов), или их комбинации. Модифицированные нуклеотиды могут иметь изменения в сахарных фрагментах и/или в фрагментах пиримидиновых или пуриновых оснований. Модификации сахара включают, например, замену одной или более гидроксильных групп галогенами, алкильными группами, аминами и азидогруппами, или сахара могут быть функционализированы в виде простых или сложных эфиров. Более того, весь сахарный фрагмент можно заменить стерически и электронно подобными структурами, такими как аза-сахара и карбоциклические аналоги сахаров. Примеры модификаций основной части включают алкилированные пурины и пиримидины, ацилированные пурины или пиримидины или другие хорошо известные гетероциклические заместители. Мономеры нуклеиновых кислот могут быть связаны фосфодизфирными связями или аналогами таких связей. Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными.

[0063] Термин «химерный антигенный рецептор» (CAR) относится к молекулам, которые объединяют связывающий домен против компонента, присутствующего на клетке-мишени, например, со специфичностью на основе антител в отношении желаемого антигена (например, опухолевого антигена, такого как MAGE-A4), с активирующим T-клеточным рецептором внутриклеточным доменом для образования химерного белка, который проявляет специфическую клеточную иммунную активность против мишени. Как правило, CAR состоят из внеклеточного связывающего домена одноцепочечного антитела (scFv), слитого с внутриклеточным сигнальным доменом дзета-цепи комплекса T-клеточного антигенного рецептора, и обладают способностью при экспрессии в T-клетках перенаправлять распознавание антигена на основе специфичности моноклональных антител.

[0064] Термин «HLA» относится к системе или комплексу человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), который представляет собой генный комплекс, кодирующий белки главного комплекса гистосовместимости (МНС) у людей. Эти белки клеточной поверхности отвечают за регуляцию иммунной системы человека. HLA, соответствующие МНС классу I (A, B и C), презентуют пептиды изнутри клетки.

[0065] Термин «HLA-A» относится к группе лейкоцитарных антигенов человека (HLA), которые кодируются локусом HLA-A. HLA-A представляет собой один из трех основных типов рецепторов клеточной поверхности класса I МНС человека. Рецептор представляет собой гетеродимер и состоит из тяжелой α -цепи и меньшей β -цепи. α -цепь

кодируется вариантом гена HLA-A, а β -цепь (β 2-микроглобулин) представляет собой инвариантную молекулу β 2-микроглобулина.

[0066] Термин «HLA-A2» представляет собой одну конкретную группу аллелей главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I в локусе HLA-A; α -цепь кодируется геном HLA-A*02, а β -цепь кодируется локусом β 2-микроглобулина или B2M.

[0067] Используемый в данном документе термин «вектор» включает, но не ограничивается, вирусный вектор, плазмиду, РНК- вектор или линейную или кольцевую молекулу ДНК или РНК, которая может состоять из хромосомных, нехромосомных, полусинтетических или синтетических нуклеиновых кислот. В некоторых случаях это векторы, способные к автономной репликации (эписомальный вектор) и/или экспрессии нуклеиновых кислот, с которыми они связаны (векторы экспрессии). Большое количество подходящих векторов известно специалистам в данной области техники и коммерчески доступно. Вирусные векторы включают ретровирус, аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированные вирусы), коронавирусы, РНК-вирусы с отрицательной цепью, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, корь и Сендай), РНК-вирусы с положительной цепью, такие как пикорнавирус и альфа-вирус, и двухцепочечные ДНК-вирусы, включая аденовирус, вирус герпеса (например, вирусы простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) и поксвирус (например, вирусы коровьей оспы, оспы птиц и оспы канареек). Другие вирусы включают, например, норовирус, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примеры ретровирусов включают лейкоз-саркому птиц, вирусы млекопитающих типа С, типа В, вирусы типа D, вирусы группы человеческого Т-клеточного лейкоза и коровьего лейкоза, и лентивирус.

[0068] «Костимулирующий домен» или «костимулирующая молекула» относится к распознаваемому партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ клетки, такой как, но не ограничиваясь этим, пролиферация. Костимулирующие молекулы включают, но не ограничиваются ими, молекулу МНС класса I, BTLA и рецептор лиганда Toll. Примеры костимулирующих молекул включают CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137) (SEQ ID NO: 29), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т.п. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличную от рецептора антигена или его лигандов, которая необходима для эффективного иммунного ответа.

[0069] «Костимулирующий лиганд» относится к молекуле на антигенпрезентирующей клетке, которая специфически связывает родственную костимулирующую молекулу на Т-клетке, тем самым обеспечивая сигнал, который в дополнение к первичному сигналу, обеспечиваемому, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, нагруженной пептидом, опосредует Т-клеточный ответ,

включая, помимо прочего, активацию пролиферации, дифференцировку и т.п. Костимулирующий лиганд может включать, помимо прочего, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцибельный костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, рецептор лимфотоксина бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, агонист или антитело, связывающее рецептор лиганда Toll, и лиганд, который специфически связывается с B7-N3. [0070] «Костимулирующий сигнал» относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к пролиферации T-клеток и/или повышению или снижению экспрессии ключевых молекул. [0071] Используемый в данном документе термин «внеклеточный лиганд-связывающий домен» относится к олиго- или полипептиду, который способен связывать лиганд, например, молекулу клеточной поверхности. Например, внеклеточный лиганд-связывающий домен может быть выбран для распознавания лиганда, который действует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с конкретным болезненным состоянием (например, злокачественным новообразованием). Примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут действовать как лиганды, включают маркеры, связанные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунными заболеваниями и раковыми клетками. Внеклеточный лиганд-связывающий домен может содержать области LCVR и HCVR (например, в формате scFv), необязательно соединенные линкером. [0072] Используемый в данном документе термин «субъект» или «пациент» включает всех представителей животного мира, включая отличных от человека приматов и людей. В одном варианте осуществления пациенты являются людьми со злокачественным новообразованием (например, множественной миеломой или меланомой). [0073] Используемый в данном документе «домен сигнальной трансдукции» или «сигнальный домен» CAR отвечает за внутриклеточный сигналинг после связывания внеклеточного лиганд-связывающего домена с мишенью, что приводит к активации иммунной клетки и иммунного ответа. Другими словами, домен сигнал трансдукции отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которой экспрессируется CAR. Например, эффекторная функция T-клетки может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, включая секрецию цитокинов. Таким образом, термин «домен сигнальной трансдукции» относится к части белка, которая передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Примерами доменов сигнальной трансдукции для применения в CAR могут быть цитоплазматические последовательности T-клеточного рецептора и корецепторов, которые действуют совместно, иницируя сигналинг после взаимодействия антигенного рецептора, а также любые производные или варианты этих последовательностей и любые синтетические последовательности, имеющие такие же функциональные возможности. В некоторых случаях сигнальные домены включают два различных класса цитоплазматических сигнальных последовательностей: те, которые иницируют антиген-зависимую первичную активацию,

и те, которые действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующий мотивы ITAM. ITAM представляют собой четко определенные сигнальные мотивы, обнаруженные во внутрицитоплазматическом хвосте множества рецепторов, которые служат сайтами связывания для тирозинкиназ класса syk/zap70. Примеры ITAM включают те, которые происходят из TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, FcR-эпсилон, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В некоторых вариантах осуществления домен сигнальной трансдукции CAR может содержать домен сигнальной трансдукции CD3-дзета (SEQ ID NO: 30).

Химерные антигенные рецепторы (CAR)

[0074] Химерные антигенные рецепторы (CAR) могут перенаправлять специфичность Т-клеток к распознаваемым антителами антигенам на поверхности клеток (например, раковых клетках), независимо от того, экспрессируются ли эти антигены на поверхности клетки или экспрессируются внутриклеточно и презентированы, например, HLA.

[0075] Один аспект настоящего изобретения включает химерный антигенный рецептор (CAR), который специфичен в отношении антигена MAGE-A4, презентруемого на поверхности клеток, таких как опухолевые клетки. Эта презентация может быть осуществлена, например, с помощью HLA, такого как HLA-A2. В одном варианте осуществления настоящего изобретения CAR, как описано в данном документе, содержит внеклеточный специфичный для мишени связывающий домен, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен (такой как сигнальный домен, полученный из CD3-дзета или FcR-гамма) и/или одну или более костимулирующих сигнальных доменов, происходящих из костимулирующей молекулы, такой как, но не ограничиваясь этим, 4-1BB. В одном варианте осуществления CAR содержит шарнир или спейсерную область между внеклеточным связывающим доменом и трансмембранным доменом, такую как шарнир CD8-альфа.

[0076] Связывающий домен или внеклеточный домен CAR обеспечивает CAR способность связываться с представляющим интерес антигеном-мишенью. Связывающий домен (например, лиганд-связывающий домен или антигенсвязывающий домен) может быть любым белком, полипептидом, олигопептидом или пептидом, который обладает способностью специфически распознавать и связываться с биологической молекулой (например, рецептором клеточной поверхности или опухолевым белком или его компонент). Связывающий домен включает любого встречающегося в природе, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного партнера по связыванию для представляющей интерес биологической молекулы. Например, и как дополнительно описано в данном документе, связывающий домен может представлять собой переменные области легкой и тяжелой цепи антитела, или переменные области легкой

и тяжелой цепей могут быть объединены вместе в одну цепь и в любой ориентации (например, VL-VH или VH-VL). Известны различные анализы для идентификации связывающих доменов по настоящему изобретению, которые специфически связываются с конкретной мишенью, включая вестерн-блоттинг, ИФА, проточную цитометрию или анализ поверхностного плазмонного резонанса (например, с использованием анализа BIACORE). Мишенью может быть антиген, представляющий клинический интерес, против которого желательно запустить эффекторный иммунный ответ, приводящий к уничтожению опухоли. В одном варианте осуществления антиген-мишень связывающего домена химерного антигенного рецептора представляет собой белок MAGE-A4 на поверхности опухолевых клеток (например, белок MAGE-A4, презентруемый HLA, такой как белок MAGE-A4, презентруемый белок HLA-A2).

[0077] Иллюстративные лиганд-связывающие домены включают антигенсвязывающие белки, такие как антигенсвязывающие фрагменты антитела, например, scFv, scTCR, внеклеточные домены рецепторов, лиганды для молекул/рецепторов клеточной поверхности или их рецептор-связывающие домены и опухолевые связывающие белки. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены, включенные в CAR по настоящему изобретению, могут представлять собой переменную область (Fv), CDR, Fab, scFv, VH, VL, вариант доменного антитела (dAb), верблюжье антитело (VHH), вариант 3 домена фибронектина, вариант анкириновых повторов и другой антигенспецифический связывающий домен, полученный из других белковых каркасов.

[0078] В одном варианте осуществления связывающий домен CAR представляет собой одноцепочечное антитело к MAGE-A4 (scFv) и может представлять собой мышинный, человеческий или гуманизированный scFv. Одноцепочечные антитела можно клонировать из генов V-области гибридомы, специфичных для желаемой мишени. Методика, которую можно использовать для клонирования переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL), описана, например, в Orlandi et al., PNAS, 1989; 86: 3833-3837. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления связывающий домен содержит связывающий домен, полученный из антитела, но может быть связывающим доменом, не являющимся производным антитела. Связывающий домен, полученный из антитела, может представлять собой фрагмент антитела или продукт, полученный с помощью генной инженерии, одного или более фрагментов антитела, причем этот фрагмент участвует в связывании с антигеном.

[0079] В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению могут содержать линкер между различными доменами, добавленный для соответствующего расположения и конформации молекулы. Например, в одном варианте осуществления может быть линкер между связывающим доменом VH или VL, длина которого может составлять от 1 до 20 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер между любым из доменов химерного антигенного рецептора может иметь длину от 1 до 15 или 15 аминокислот. В этом отношении линкер может иметь длину 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. В дополнительных вариантах осуществления линкер может иметь длину 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. Диапазоны, включающие числа, описанные в данном документе, также включены в данный документ, например, линкер длиной 10-30 аминокислот.

[0080] В некоторых вариантах осуществления линкеры, подходящие для применения в описанном в данном документе CAR, являются гибкими линкерами. Подходящие линкеры могут быть легко выбраны и могут иметь любую подходящие различные длины, такую как от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 до 15 аминокислот, от 3 до 12 аминокислот, включая от 4 до 10 аминокислот, от 5 до 9 аминокислот, от 6 до 8 аминокислот или от 7 до 8 аминокислот, и могут представлять собой 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот.

[0081] Примеры гибких линкеров включают глициновые полимеры (G)_n, глицин-сериновые полимеры, где n является целым числом, равным по меньшей мере одному, полимеры глицин-аланин, полимеры аланин-серин и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Глициновые и глицин-сериновые полимеры относительно неструктурированы и поэтому могут служить нейтральной связью между доменами слитых белков, таких как CAR, описанные в данном документе. Глицин имеет доступ к значительно большему количеству фи-пси пространству, чем даже аланин, и значительно менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Обычному специалисту в данной области техники понятно, что конструкция CAR может содержать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может содержать гибкий линкер, а также одну или более частей, которые придают менее гибкую структуру для обеспечения желаемой структуры CAR. Конкретные линкеры включают линкеры (G4S)_n, где n=1-3, как показано в SEQ ID NO: 23-25. Другой иллюстративный линкер представлен как SEQ ID NO: 26. Линкер может присутствовать между областями LCVR и HCVR CAR, между вариательной областью (например, HCVR) и шарнирной областью (такой как шарнир CD8α) или и тем, и другим. Например, настоящее изобретение обеспечивает CAR, содержащий линкер (G4S)₃ между LCVR и HCVR и линкер (G4S)₁ между HCVR и шарниром CD8α.

[0082] За связывающим доменом CAR может следовать «спейсер» или «шарнир», который относится к области, которая перемещает антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторной клетки, чтобы обеспечить надлежащий контакт клетки/клетки, связывание антигена и активацию (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). Шарнирная область в CAR, как правило, находится между трансмембранным (TM) и связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и может быть шарнирной областью иммуноглобулина дикого типа или измененной шарнирной областью иммуноглобулина дикого типа. Другие иллюстративные шарнирные области, используемые в CAR, описанных в данном документе, включают шарнирную область, происходящую из

внутриклеточных областей мембранных белков типа 1, таких как CD8-альфа, CD4, CD28 и CD7, которые могут быть шарнирными областями дикого типа от этих молекул или могут быть изменены. В одном варианте осуществления шарнирная область включает шарнир CD8-альфа (SEQ ID NO: 27).

[0083] «Трансмембранная» область или домен представляет собой часть CAR, которая прикрепляет внеклеточную связывающую часть к плазматической мембране иммунной эффекторной клетки и облегчает связывание связывающего домена с целевым антигеном. Трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CD3-дзета, однако можно использовать другие трансмембранные домены, включая те, которые получены из CD8-альфа, CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В одном варианте осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD137. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является синтетическим, и в этом случае он может содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

[0084] «Внутриклеточный сигнальный домен» или «сигнальный домен» относится к части белка химерного антигенного рецептора, который участвует в трансдукции сигнала об эффективном связывании CAR с целевым антигеном во внутреннюю часть иммунной эффекторной клетки, чтобы вызвать функцию эффекторной клетки, например, активацию, продукцию цитокинов, пролиферацию и цитотоксическую активность, включая высвобождение цитотоксических факторов в CAR-связанную целевую клетку, или другие клеточные ответы, вызванные связыванием антигена с внеклеточным доменом CAR. Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторной функцией Т-клетки, например, может быть цитолитическая активность, или хелперная активность, включая секрецию цитокина. Таким образом, термины «внутриклеточный сигнальный домен» или «сигнальный домен», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к части белка, которая трансдуцирует сигнал эффекторной функции и которая направляет клетку на выполнение специализированной функции. Тогда как обычно может использоваться весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать весь домен. В той степени, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо всего домена до тех пор, пока она трансдуцирует сигнал эффекторной функции. Термин «внутриклеточный сигнальный домен» включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для трансдукции сигнала эффекторной функции. Внутриклеточный сигнальный домен также известен как «домен сигнальной трансдукции» и обычно происходит из частей человеческих цепей CD3 или FcRγ.

[0085] Известно, что сигналов, генерируемых только через Т-клеточный рецептор, недостаточно для полной активации Т-клетки, и что также требуется вторичный или

костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток опосредуется двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антиген-зависимую первичную активацию через Т-клеточный рецептор (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). Цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют костимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM.

[0086] Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые имеют особое применение в настоящем изобретении, включают последовательности, полученные из TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В одном конкретном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен описанных в данном документе CAR к MAGE-A4 получают из CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

[0087] Используемый в данном документе термин «костимулирующий сигнальный домен» или «костимулирующий домен» относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от рецепторов антигена или Fc-рецепторов, которые обеспечивают второй сигнал, необходимый для эффективной активации и функционирования Т-лимфоцитов при связывании с антигеном. Примеры таких костимулирующих молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C, B7-H2 и лиганд, специфически связывающий CD83. Соответственно, хотя в настоящем изобретении представлены иллюстративные костимулирующие домены, полученные из CD3-дзета и 4-1BB, другие костимулирующие домены рассматриваются для применения с CAR, описанными в данном документе. Включение одного или более костимулирующих сигнальных доменов может повысить эффективность и экспансию Т-клеток, экспрессирующих рецепторы CAR. Внутриклеточные сигнальные и костимулирующие сигнальные домены могут быть связаны в любом порядке тандемно с карбоксильным концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

[0088] Несмотря на то, что CAR на основе scFv, сконструированные так, чтобы содержать сигнальный домен из CD3 или FcR-гамма, как было показано, доставляют мощный сигнал для активации Т-клеток и эффекторной функции, их недостаточно для выработки сигналов, которые способствуют выживаемости и размножению Т-клеток в отсутствие сопутствующего костимулирующего сигнала. Другие CAR, содержащие связывающий домен, шарнирный, трансмембранный и сигнальный домен, полученный из

CD3-дзета или FcR-гамма, вместе с одним или более костимулирующими сигнальными доменами (например, внутриклеточные костимулирующие домены, полученные из CD28, CD137, CD134 и CD278) могут более эффективно направлять противоопухолевую активность, а также повышать секрецию цитокинов, литическую активность, выживаемость и пролиферацию CAR-экспрессирующих Т-клеток *in vitro*, а также в моделях на животных и онкологических больных (Milone et al., *Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong et al., *Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito et al., *PNAS*, 2009; 106:3360-3365).

[0089] В различных вариантах осуществления CAR к MAGE-A4 согласно настоящему изобретению содержат (a) scFv к MAGE-A4 в качестве связывающего домена (например, scFv, имеющий связывающие области (например, CDR или переменные домены) из антитела к MAGE-A4, идентифицированного в таблице 1) (b) шарнирную область, полученную из CD8-альфа человека, (c) трансмембранный домен CD8-альфа человека и (d) внутриклеточный сигнальный домен дзета-цепи CD3 (CD3) Т-клеточного рецептора человека, и необязательно один или более костимулирующих сигнальных доменов, например, 4-1BB. В одном варианте осуществления различные белковые домены расположены от N-конца до C-конца в следующем порядке: связывающий домен, шарнирная область и трансмембранный домен. Внутриклеточный сигнальный домен и необязательные костимулирующие сигнальные домены связаны с трансмембранным C-концом в любом порядке тандемно с образованием одноцепочечного химерного полипептида. В одном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR к MAGE-A4, представляет собой молекулу химерной нуклеиновой кислоты, включающую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую различные кодирующие последовательности, например (от 5' до 3') кодирующие последовательности человеческого scFv к MAGE-A4, шарнир CD8-альфа человека, трансмембранный домен CD8-альфа человека и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. В еще одном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR к MAGE-A4, представляет собой молекулу химерной нуклеиновой кислоты, включающую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую различные кодирующие последовательности, например (от 5' до 3') кодирующие последовательности человеческого scFv к MAGE-A4, шарнир CD8-альфа человека, трансмембранный домен CD8-альфа человека, костимулирующий домен 4-1BB и костимулирующий домен CD3-дзета.

[0090] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий описанный в данном документе CAR, вставлен в вектор. Вектор представляет собой носитель, в который может быть ковалентно вставлен полинуклеотид, кодирующий белок, чтобы вызвать экспрессию этого белка и/или клонирование полинуклеотида. Такие векторы также могут называться «векторами экспрессии». Выделенный полинуклеотид может быть вставлен в вектор с использованием любых подходящих способов, известных в данной области техники, например, но не ограничиваясь этим, вектор может быть

расщеплен с использованием подходящих ферментов рестрикции, а затем может быть лигирован с выделенным полинуклеотидом, имеющим совпадающие рестрикционные концы. Векторы экспрессии могут иметь способность включать и экспрессировать гетерологичные или модифицированные последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие по меньшей мере часть генного продукта, способного транскрибироваться в клетке. В большинстве случаев молекулы РНК затем транслируются в белок. Векторы экспрессии могут содержать множество регуляторных последовательностей, которые относятся к последовательностям нуклеиновой кислоты, необходимым для транскрипции и, возможно, трансляции функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. В дополнение к контрольным последовательностям, которые регулируют транскрипцию и трансляцию, векторы и векторы экспрессии могут содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые также выполняют другие функции и обсуждаются ниже. Вектор экспрессии может содержать дополнительные элементы, например, вектор экспрессии может иметь две системы репликации, что позволяет поддерживать его в двух организмах, например, в клетках человека для экспрессии и в прокариотическом хозяине для клонирования и амплификации.

[0091] Вектор экспрессии может иметь необходимые 5'- и 3'-регуляторные элементы, такие как промоторные последовательности, такие как промоторы CMV, PGK и EF1-альфа, TATA-бокс распознавания и связывания рибосом, и последовательность терминации транскрипции AAUAAA 3'-UTR для эффективной транскрипции и трансляции гена в соответствующей клетке-хозяине. Другие подходящие промоторы включают конститутивный ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор LTR ВИЧ, промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно ранний промотор EBV и промотор вируса саркомы Рауса. Также можно использовать промоторы генов человека, включая, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. В некоторых вариантах осуществления индуцируемые промоторы также рассматриваются как часть векторов, экспрессирующих химерный антигенный рецептор. Это обеспечивает молекулярный переключатель, способный включить экспрессию представляющей интерес полинуклеотидной последовательности или выключить экспрессию. Примеры индуцибельных промоторов включают, но не ограничиваются ими, промотор металлотинина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона или промотор тетрациклина.

[0092] Вектор экспрессии может иметь дополнительную последовательность, такую как бх-гистидиновые метки, метки с-Мус и FLAG, которые включены в экспрессируемые CAR. Таким образом, вектор экспрессии может быть сконструирован таким образом, чтобы он содержал 5'- и 3'-нетранслируемые регуляторные последовательности, которые иногда могут функционировать как энхансерные последовательности, промоторные области и/или терминаторные последовательности, которые могут облегчить или усилить эффективную транскрипцию представляющей

интерес нуклеиновой кислоты (кислот), переносимой в вектор экспрессии. Вектор экспрессии также может быть сконструирован для функции репликации и/или экспрессии (например, транскрипции и трансляции) в конкретном типе клетки, расположении клетки или типе ткани. Векторы экспрессии могут включать селективируемый маркер для поддержания вектора в клетке-хозяине или реципиентной клетке.

[0093] В различных вариантах осуществления векторы представляют собой плазмиду, автономно реплицирующиеся последовательности и транспозируемые элементы. Дополнительные иллюстративные векторы включают, но не ограничиваясь этим, плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как искусственная хромосома дрожжей (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома на основе P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, и вирусы животных. Примеры категорий вирусов животных, используемых в качестве векторов, включают, но не ограничиваясь этим, ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус и паповавирус (например, SV40). Примерами векторов экспрессии являются векторы системы бицистронной экспрессии Lenti-X™ (Neo) (Clontech), векторы pCIneo (Promega) для экспрессии в клетках млекопитающих; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™, и pLenti6.2N5-GW/lacZ для опосредованного лентивирусом переноса генов и экспрессии в клетках млекопитающих. Кодированные последовательности CAR, описанные в данном документе, можно лигировать в такие векторы экспрессии для экспрессии химерного белка в клетках млекопитающих.

[0094] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по настоящему изобретению, представлены в вирусном векторе. Вирусный вектор может быть получен из ретровируса, лентивируса или пенящего вируса. Используемый в данном документе термин «вирусный вектор» относится к конструкции вектора нуклеиновой кислоты, которая включает по меньшей мере один элемент вирусного происхождения и обладает способностью упаковываться в частицу вирусного вектора. Вирусный вектор может содержать кодирующую последовательность для различных химерных белков, описанных в данном документе, вместо несущественных вирусных генов. Вектор и/или частицу можно использовать для переноса ДНК, РНК или других нуклеиновых кислот в клетки либо *in vitro*, либо *in vivo*. В данной области техники известны многочисленные формы вирусных векторов.

[0095] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор, содержащий кодирующую последовательность для CAR, описанного в данном документе, представляет собой ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Термин «ретровирусный вектор» относится к вектору, содержащему структурные и функциональные генетические элементы, которые в основном получены из ретровируса. Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, содержащему структурные и функциональные генетические элементы вне LTR, которые в основном получены из

лентивируса.

[0096] Ретровирусные векторы, применяемые в данном документе, могут быть получены из любого известного ретровируса (например, ретровирусов типа с, таких как вирус саркомы мышей Молони (MoMSV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкоза гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошек (FLV), спумавирус, вирус лейкоза Френда, вирус стволовых клеток мыши (MSCV) и вирус саркомы Рауса (RSV)). Ретровирусы по настоящему изобретению также включают вирусы Т-клеточного лейкоза человека, HTLV-1 и HTLV-2, и лентивирусное семейство ретровирусов, таких как вирусы иммунодефицита человека, HIV-1, HIV-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита лошадей (EIV) и другие классы ретровирусов.

[0097] Лентивирусный вектор, используемый в данном документе, относится к вектору, полученному из лентивируса, группы (или рода) ретровирусов, которые вызывают медленно развивающееся заболевание. Вирусы, включенные в эту группу, включают HIV (вирус иммунодефицита человека; включая HIV типа 1 и HIV типа 2); вирус висна-маэди; вирус артрита-энцефалита коз и овец; вирус инфекционной анемии у лошадей; вирус иммунодефицита кошачьих (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV); и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). Получение рекомбинантного лентивируса может быть достигнуто с использованием способов согласно Dull et al. and Zufferey et al. (Dull et al., J. Virol., 1998; 72: 8463-8471 и Zufferey et al., J. Virol. 1998; 72:9873-9880).

[0098] Ретровирусные векторы (т.е. как лентивирусные, так и нелентивирусные) для применения в настоящем изобретении могут быть получены с использованием стандартных методов клонирования путем объединения желаемых последовательностей ДНК в порядке и ориентации, описанных в данном документе (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14 и других стандартных лабораторных руководствах; Eglitis, et al. (1985) Science 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Kay et al. (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) J. Immunol 150:4104-4115; патенте США № 4868116; патенте США № 4980286; публикации PCT WO 89/07136; публикации PCT WO 89/02468; публикации PCT WO 89/05345; и публикации PCT WO 92/07573).

[0099] Подходящие источники для получения ретровирусных (т.е. как лентивирусных, так и нелентивирусных) последовательностей для применения в получении векторов включают, например, геномную РНК и кДНК, доступные из коммерчески доступных источников, включая Коллекцию типовых культур (ATCC),

Роквилл, штат Мэриленд. Последовательности также можно синтезировать химическим путем.

[0100] Для экспрессии CAR к MAGE-A4 вектор можно ввести в клетку-хозяин, чтобы обеспечить экспрессию полипептида в клетке-хозяине. Векторы экспрессии могут содержать множество элементов для регуляции экспрессии, включая, помимо прочего, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, селективируемые маркеры и сигнальные последовательности. Данные элементы могут быть выбраны соответствующим образом специалистом в данной области техники, как описано в данном документе. Например, промоторные последовательности могут быть выбраны для стимуляции транскрипции полинуклеотида в векторе. Подходящие промоторные последовательности включают, но не ограничиваясь этим, промотор T7, промотор T3, промотор SP6, промотор бета-актина, промотор EF1a, промотор CMV и промотор SV40. Для усиления транскрипции полинуклеотида могут быть выбраны энхансерные последовательности. Селективируемые маркеры могут быть выбраны для обеспечения возможности отбора клеток-хозяев, вставленных с вектором, из тех, которые не являются, например, селективируемые маркеры могут быть генами, которые придают устойчивость к антибиотикам. Сигнальные последовательности могут быть выбраны, чтобы обеспечить транспортировку экспрессированного полипептида за пределы клетки-хозяина.

[0101] Для клонирования полинуклеотида вектор можно ввести в клетку-хозяин (выделенную клетку-хозяин), чтобы обеспечить репликацию самого вектора и тем самым амплифицировать копии содержащегося в нем полинуклеотида. Клонирование векторы могут содержать компоненты последовательности, которые обычно включают, но не ограничиваясь этим, точку начала репликации, промоторные последовательности, промоторы инициации транскрипции, энхансерные последовательности и селективируемые маркеры. Данные элементы могут быть выбраны соответствующим образом специалистом в данной области техники. Например, точка начала репликации может быть выбрана для стимуляции автономной репликации вектора в клетке-хозяине.

[0102] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает выделенные клетки-хозяева, содержащие векторы, представленные в данном документе. Клетки-хозяева, содержащие вектор, могут быть полезны для экспрессии или клонирования полинуклеотида, содержащегося в векторе. Подходящие клетки-хозяева могут включать, но не ограничиваясь этим, прокариотические клетки, клетки гриба, дрожжевые клетки или клетки высших эукариот, например, клетки млекопитающих. Подходящие прокариотические клетки для этой цели включают, но не ограничиваясь этим, эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacterales, такие как Escherichia, например, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например, Salmonella typhimurium, Serratia, например, Serratia marcescans, и Shigella, а также Bacilli, например, B. subtilis и B. licheniformis, Pseudomonas, например, P. aeruginosa, и Streptomyces.

[0103] CAR по настоящему изобретению вводят в клетку-хозяина с использованием методов трансфекции и/или трансдукции, известных в данной области техники. Используемые в данном документе термины «трансфекция» и «трансдукция» относятся к процессам, посредством которых экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты вводится в клетку-хозяин. Нуклеиновая кислота может быть интегрирована в ДНК клетки-хозяина или может сохраняться вне хромосом. Нуклеиновая кислота может сохраняться транзистентно или может быть стабильной. Трансфекция может осуществляться различными способами, известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, соосаждение ДНК фосфатом кальция, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, опосредованную полибренном трансфекцию, электропорацию, микроинъекцию, слияние липосом, липофекцию, слияние протопластов, ретровирусную инфекцию и биобаллистику. Трансдукция относится к доставке гена(-ов) с использованием вирусного или ретровирусного вектора посредством вирусной инфекции, а не путем трансфекции. В некоторых вариантах осуществления ретровирусные векторы трансдуцируют путем упаковки векторов в вирионы перед приведением в контакт с клеткой. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая CAR к MAGE-A4, переносимая ретровирусным вектором, может быть трансдуцирована в клетку посредством инфекции и интеграции провируса.

[0104] Используемый в данном документе термин «генетически сконструированный» или «генетически модифицированный» относится к добавлению дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК в общий генетический материал в клетке. Термины «генетически модифицированные клетки», «модифицированные клетки» и «перенаправленные клетки» используются взаимозаменяемо.

[0105] В частности, CAR по настоящему изобретению вводится и экспрессируется в иммунных эффекторных клетках, чтобы перенаправить их специфичность на представляющий интерес антиген-мишень, например, злокачественную клетку, экспрессирующую MAGE-A4, такую как злокачественная клетка, презентующую MAGE-A4 с HLA-A2.

[0106] В настоящем изобретении предложены способы получения иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют CAR, как описано в данном документе. В одном варианте осуществления способ включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных от субъекта, такого как субъект, имеющий опухолевую клетку, экспрессирующую MAGE-A4, так что иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или более CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки выделяют от индивидуума и генетически модифицируют без дополнительных манипуляций *in vitro*. Такие клетки можно затем повторно вводить индивидууму. В дополнительных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки сначала активируют и стимулируют для пролиферации *in vitro* перед их генетической модификацией для экспрессии CAR. В этом

отношении иммунные эффекторныe клетки можно культивировать до или после генетической модификации (т.е. трансдукции или трансфекции для экспрессии CAR, как описано в данном документе).

[0107] Перед манипуляциями *in vitro* или генетической модификацией иммунных эффекторных клеток, описанных в данном документе, источник клеток может быть получен от субъекта. В частности, иммунные эффекторные клетки для применения с CAR, как описано в данном документе, содержат Т-клетки. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань вилочковой железы, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта, с использованием любого количества способов, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение в градиенте фиколла. В одном варианте осуществления клетки из циркулирующей крови индивидуума получают посредством афереза. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоцит, В-клетки, другие ядросодержащие белые клетки крови, эритроциты и тромбоциты. В одном варианте осуществления клетки, собранные посредством афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для дальнейших этапов обработки. В одном варианте осуществления настоящего изобретения клетки промывают PBS. В альтернативном варианте осуществления раствор для промывания не содержит кальций и может не содержать магний или может не содержать многие, если не все, двухвалентные катионы. Специалистам в данной области техники будет понятно, что этап промывки может выполняться способами, известными специалистам в данной области техники, например, с использованием полуавтоматической проточной центрифуги. После промывания клетки могут быть ресуспендированы в различных биосопоставимых буферах или другом солевом растворе с буфером или без него. В некоторых вариантах осуществления нежелательные компоненты образца афереза могут быть извлечены из культуральной среды, непосредственно ресуспендированной клетками.

[0108] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) путем лизирования эритроцитов и истощения моноцитов, например, центрифугированием в градиенте PERCOLLTM. Конкретная субпопуляция Т-клеток, таких как CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+, и CD45RO+ Т-клетки может быть дополнительно выделена методиками положительной или отрицательной селекции. Например, обогащение популяции Т-клеток путем отрицательного отбора может быть достигнуто с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отобранных клеток. Один способ для применения в данном документе представляет собой сортировку и/или селекции клеток посредством отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которых применяют смесь моноклональных антител,

направленных на маркеры поверхности клетки, присутствующие на отрицательно выбранных клетках. Например, для обогащения CD4⁺ клеток путем отрицательной селекции коктейль моноклональных антител, как правило, включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Проточную цитометрию и сортировку клеток также можно применять для выделения представляющих интерес популяции клеток для применения по настоящему изобретению.

[0109] МКПК можно использовать непосредственно для генетической модификации CAR с использованием способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления после выделения МКПК дополнительно выделяют Т-лимфоциты, и в определенных вариантах осуществления как цитотоксические Т-клетки, так и Т-хелперы можно разделить на субпопуляции наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток либо до, либо после генетической модификации и/или размножения. CD8⁺ клетки можно получить стандартными способами. В некоторых вариантах осуществления CD8⁺ клетки дополнительно сортируют на наивные клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации поверхностных антигенов клетки, которые связаны с каждым из этих типов CD8⁺ клеток. В вариантах осуществления Т-клетки памяти присутствуют как в субпопуляциях CD62L⁺, так и в CD62L⁻ CD8⁺ лимфоцитов периферической крови. МКПК разделяют на фракции CD62L⁻ CD8⁺ и CD62L⁺ CD8⁺ после окрашивания антителами к CD8 и CD62L. В некоторых вариантах осуществления экспрессия фенотипических маркеров ТСМ центральной памяти включает CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и CD127 и является отрицательной в отношении гранзима В. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки центральной памяти представляют собой CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки являются отрицательными в отношении CD62L, CCR7, CD28 и CD127 и положительными в отношении гранзима В и перфорина. В некоторых вариантах осуществления наивные CD8⁺ Т-лимфоциты характеризуются экспрессией фенотипических маркеров наивных Т-клеток, включая CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 и CD45RA.

[0110] В некоторых вариантах осуществления CD4⁺ Т-клетки дополнительно разделяют на субпопуляции. Например, CD4⁺ Т-хелперы можно разделить на наивные клетки, клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций, которые имеют антигены клеточной поверхности. CD4⁺ лимфоциты можно получить стандартными способами. В некоторых вариантах осуществления наивные CD4⁺ Т-лимфоциты представляют собой CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺ CD4⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления CD4⁺ клетки центральной памяти являются CD62L⁻положительными и CD45RO⁻положительными. В некоторых вариантах осуществления эффекторные CD4⁺ клетки являются CD62L⁻ и CD45RO⁻ отрицательными.

[0111] Иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, могут быть генетически модифицированы после выделения с использованием известных способов,

или иммунные эффекторные клетки могут быть активированы и размножены (или дифференцированы в случае предшественников) *in vitro* перед генетической модификацией. В другом варианте осуществления иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицированы описанными в данном документе химерными антигенными рецепторами (например, трансдуцированы вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR), а затем их активируют и размножают *in vitro*. Способы активации и размножения Т-клеток известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 6905874; патенте США № 6867041; патенте США № 6797514; WO2012079000. Как правило, такие способы включают приведение в контакт МКПК или выделенных Т-клеток со стимулирующим агентом и костимулирующим агентом, например, антителами к CD3 и к CD28, как правило, присоединенными к частице или другой поверхности, в культуральной среде с соответствующими цитокинами, такими как IL-2. Антитела к CD3 и к CD28, присоединенные к одной и той же частице, служат «суррогатными» антигенпрезентирующими клетками (APC). В других вариантах осуществления Т-клетки могут быть активированы и стимулированы для пролиферации питающими клетками и соответствующими антителами и цитокинами с использованием способов, таких как те, что описаны в патентах США № 6040177; патенте США № 5827642; и WO2012129514.

[0112] В настоящем изобретении представлена популяция модифицированных иммунных эффекторных клеток для лечения пациента, имеющего злокачественное новообразование, вызванное опухолью, экспрессирующей MAGE-A4, например, множественной миеломой или меланомой, при этом модифицированные иммунные эффекторные клетки, содержащие CAR к MAGE-A4, описаны в данном документе.

[0113] CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, полученные, как описано в данном документе, можно использовать в способах и композициях адоптивной иммунотерапии в соответствии с известными методиками или их вариациями, которые будут очевидны специалистам в данной области техники на основании настоящего изобретения. См., например, публикацию патентной заявки США № 2003/0170238, Gruenberg et al; см. также патент США № 4690915, Rosenberg.

[0114] В некоторых вариантах осуществления клетки составлены путем первого их сбора из их культуральной среды, а затем промывания и концентрации клеток в среде и системе хранения, пригодной для введения («фармацевтически приемлемый» носитель) в эффективном для лечения количестве. Подходящей инфузионной средой может быть любой состав изотонической среды, как правило, физиологический раствор, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), но также можно использовать 5% декстрозу в воде или лактат Рингера. Инфузионная среда может быть дополнена человеческим сывороточным альбумином.

[0115] Эффективное для лечения количество клеток в композиции составляет по меньшей мере 2 клетки (например, по меньшей мере 1 CD8⁺ Т-клетка центральной памяти и по меньшей мере 1 субпопуляция CD4⁺ Т-лимфоцитов) или, как правило, больше 10²

клеток и до 10^6 , включая 10^8 или 10^9 клеток, и может быть больше 10^{10} клеток. Количество клеток будет зависеть от конечного применения, для которого предназначена композиция, а также от типа содержащихся в ней клеток.

[0116] Клетки могут быть аутологичными или гетерологичными по отношению к пациенту, проходящему терапию. При желании лечение может также включать введение митогенов (например, РНА) или лимфокинов, цитокинов и/или хемокинов (например, IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α , IL-18, и TNF- β , GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α и т.д.), как описано в данном документе, для усиления индукции иммунного ответа.

[0117] Популяции экспрессирующих CAR иммунных эффекторных клеток по настоящему изобретению можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, например, IL-2 или другими цитокинами или популяцией клеток. Вкратце, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать популяцию экспрессирующих CAR иммунных эффекторных клеток, таких как Т-клетки, как описано в данном документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно составляют для внутривенного введения.

[0118] Противоопухолевый иммунный ответ, индуцированный у субъекта введением экспрессирующих CAR Т-клеток, описанных в данном документе, с использованием описанных в данном документе способов или других способов, известных в данной области техники, может включать клеточные иммунные ответы, опосредованные цитотоксическими Т-клетками, способными убивать инфицированные клетки, ответы регуляторных Т-клеток и хелперных Т-клеток. Также могут быть индуцированы гуморальные иммунные ответы, опосредованные в первую очередь хелперными Т-клетками, способными активировать В-клетки, что приводит к продукции антител. Для анализа типа иммунных ответов, индуцированных композициями по настоящему изобретению, могут использоваться различные способы, которые хорошо описаны в данной области техники; например, *Current Protocols in Immunology*, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

[0119] Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способы лечения индивидуума, у которого диагностировано или подозревается наличие или риск развития злокачественного новообразования, характеризуемого, по меньшей мере частично, экспрессией MAGE-A4 раковыми клетками (например, экспрессирующими MAGE-A4 клетками солидной опухоли), включающий введение индивидууму терапевтически

эффективного количества экспрессирующих CAR иммунных эффекторных клеток, как описано в данном документе.

[0120] В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения субъекта, у которого диагностировано злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, включающий извлечение эффекторных иммунных клеток у субъекта, у которого диагностировано злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, генетическую модификацию указанных иммунных эффекторных клеток с помощью вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению, тем самым создавая популяцию модифицированных иммунных эффекторных клеток, и введение популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток тому же субъекту. В одном варианте осуществления эффекторные иммунные клетки включают Т-клетки.

[0121] Способы введения описанных в данном документе композиций клеток включают любой способ, который эффективен при повторном введении *ex vivo* генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые либо непосредственно экспрессируют CAR согласно настоящему изобретению у субъекта, либо при повторном введении генетически модифицированных предшественников иммунных эффекторных клеток, которые при введении субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие CAR. Один способ включает трансдукцию Т-клеток периферической крови *ex vivo* конструкцией нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением и возвращение трансдуцированных клеток субъекту.

Связывающие свойства химерных антигенных рецепторов и соответствующих антител

[0122] Используемый в данном документе термин «связывание» в контексте связывания химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела, например, с заранее определенным антигеном, таким как белок клеточной поверхности или его фрагмент (или с антигеном, связанным с белком клеточной поверхности, таким как молекула HLA). Связывание, как правило, относится к взаимодействию или ассоциации между минимум двумя объектами или молекулярными структурами, например, взаимодействию антигенсвязывающий домен: антиген.

[0123] Например, аффинность связывания, как правило, соответствует значению K_D примерно 10^{-7} М или меньше, например, около 10^{-8} М или меньше, например, около 10^{-9} М или меньше, при определении, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) в приборе BIAcore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда и антитела или химерного антигенного рецептора в качестве анализата (или антилиганда). Также обычно используются стратегии связывания на основе клеток, такие как анализы связывания методом флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS), и данные FACS хорошо коррелируют с другими методами, такими как конкурентное связывание радиолигандов и ППР (Benedict, CA, J Immunol Methods. 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA,

et al. *J Immunol Methods*. 2005, 302(1-2):68-77).

[0124] Соответственно, химерный антигенный рецептор или соответствующее антитело по настоящему изобретению связывается с заранее определенным антигеном или молекулой клеточной поверхности (рецептором), имеющей аффинность, соответствующую значению K_D , которое по меньшей мере в десять раз ниже, чем его аффинность для связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином). Как описано в данном документе, химерный антигенный рецептор или соответствующее антитело по настоящему изобретению может связываться с презентуемым HLA антигеном MAGE-A4, например, с презентуемым HLA-A2 антигеном MAGE-A4. Согласно настоящему изобретению аффинность химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела со значением K_D , которое равно или меньше чем в десять раз ниже, чем у неспецифического антигена, можно рассматривать как необнаруживаемое связывание.

[0125] Термин « K_D » (M) относится к константе равновесия диссоциации взаимодействия конкретного антигенсвязывающего домена с антигеном или константе равновесия диссоциации соответствующего антитела к антигену. Между K_D и аффинностью связывания существует обратная зависимость, поэтому чем меньше значение K_D , тем выше, то есть, сильнее, аффинность. Таким образом, термины «более высокая аффинность» или «более сильная аффинность» относятся к более высокой способности вступать во взаимодействие и, следовательно, к меньшему значению K_D , и, наоборот, термины «более низкая аффинность» или «более слабая аффинность» относятся к более низкой способности вступать во взаимодействие и, следовательно, большему значению K_D . В некоторых обстоятельствах более высокая аффинность связывания (или K_D) конкретной молекулы (например, химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела) с молекулой-партнером (например, антигеном X) по сравнению со аффинностью связывания молекулы (например, химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела) с другой взаимодействующей молекулой-партнером (например, антигеном Y) может быть выражена в виде коэффициента связывания, определяемого путем деления большего значения K_D (более низкая или более слабая аффинность) на меньшую K_D (более высокая или более сильная аффинность), например, может быть выражена как 5-кратное или 10-кратное превышение аффинности связывания, в зависимости от конкретного случая.

[0126] Термин « k_d » (сек-1 или 1/с) относится к константе скорости диссоциации взаимодействия конкретного антигенсвязывающего домена с антигеном или к константе скорости диссоциации химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела. Указанное значение также называется значением k_{off} .

[0127] Термин " k_a " (M-1 x сек-1 или 1/M) относится к константе скорости ассоциации взаимодействия конкретного антигенсвязывающего домена с антигеном или к константе скорости ассоциации химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела.

[0128] Термин « K_A » (M^{-1} или $1/M$) относится к константе равновесия ассоциации для взаимодействия конкретный антигенсвязывающий домен: антиген или к константе равновесия ассоциации химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела. Равновесную константу ассоциации получают делением k_a на k_d .

[0129] Термин « EC_{50} » или « EC_{50} » относится к полумаксимальной эффективной концентрации, которая включает концентрацию химерного антигенного рецептора, которая вызывает ответ на половину между исходным уровнем и максимумом после определенного времени воздействия. EC_{50} по существу представляет собой концентрацию химерного антигенного рецептора или антитела, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. В некоторых вариантах осуществления значение EC_{50} равно концентрации химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела по настоящему изобретению, которая дает полумаксимальное связывание с клетками, экспрессирующими антиген (например, опухолеассоциированный антиген, такой как MAGE-A4), как определено, например, при помощи анализа связывания методом FACS. Таким образом, сниженное или более слабое связывание наблюдается при повышенном значении EC_{50} или полумаксимальной эффективной концентрации.

[0130] В одном варианте осуществления сниженное связывание может быть определено как повышенная концентрации в виде EC_{50} химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела, которая обеспечивает связывание с полумаксимальным количеством клеток-мишеней.

Варианты последовательностей химерных антигенных рецепторов

[0131] Химерные антигенные рецепторы или рецепторы согласно настоящему изобретению могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены отдельные антигенсвязывающие домены соответствующих антител. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Химерные антигенные рецепторы по настоящему изобретению могут содержать антигенсвязывающие домены, происходящие из любой из иллюстративных аминокислотных последовательностей CDR или переменной области, описанных в данном документе, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или областях CDR мутированы в соответствующий остаток(-ки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено соответствующее антитело, или в соответствующий остаток(-ки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего(-их) остатка(-ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в совокупности называются в настоящем документе «мутациями зародышевой линии»). Специалист в данной области техники, начиная с

описанных в данном документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получить многочисленные антитела, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В отдельных вариантах осуществления все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах V_H и/или V_L мутированы обратно в остатки, содержащиеся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой был первоначально получен антигенсвязывающий домен. В других вариантах осуществления только некоторые остатки мутированы обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, содержащиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, содержащиеся в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более каркасных остатков и/или остатков CDR мутированы в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевой линии (т. е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой был первоначально получен антигенсвязывающий домен). Кроме того, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, например, при которых некоторые отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или мутированы в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии.

Биологические характеристики химерных антигенных рецепторов и соответствующих антител

[0132] В настоящем изобретении предложены химерные антигенные рецепторы с антигенсвязывающими доменами, полученными из антител, которые связывают MAGE-A4 человека с высокой аффинностью (например, с наномолярными или субнаномолярными значениями K_D).

[0133] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к химерным антигенным рецепторам с антигенсвязывающими доменами, полученными из соответствующих антител, которые связывают MAGE-A4 человека (например, при 25°C) с K_D менее около 5 нМ, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых вариантах осуществления соответствующие антитела связывают MAGE-A4 с K_D менее около 20 нМ, менее около 10 нМ, менее около 8 нМ, менее около 7 нМ, менее около 6 нМ, менее около 5 нМ, менее около 4 нМ, менее около 3 нМ, менее около 2 нМ, менее около 1 нМ, менее около 800 пМ, менее около 700 пМ, менее около 500 пМ, менее около 400 пМ, менее около 300 пМ, менее около 200 пМ, менее около 100 пМ, менее около 50 пМ или менее около 25 пМ при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса.

[0134] В настоящем изобретении также предложены химерные антигенные рецепторы с антигенсвязывающими доменами, происходящими от соответствующих

антител, которые связывают MAGE-A4 с диссоциационным периодом полувыведения ($t_{1/2}$) более чем около 10 минут или более чем около 125 минут, по данным поверхностного плазмонного резонанса при 25°C. В некоторых вариантах осуществления соответствующие антитела связывают MAGE-A4 с $t_{1/2}$ более около 3 минут, более около 4 минут, более около 10 минут, более около 20 минут, более около 30 минут, более около 40 минут, больше около 50 минут, больше около 60 минут, больше около 70 минут, больше около 80 минут, больше около 90 минут, больше около 100 минут, больше около 110 минут или больше около 120 минут, по данным поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

[0135] В настоящем изобретении также предложены химерные антигенные рецепторы с антигенсвязывающими доменами, происходящими из соответствующих антител, которые специфически связываются с линиями клеток человека, которые экспрессируют эндогенный MAGE-A4, по данным анализа связывания методом FACS.

[0136] В настоящем изобретении также предложены сконструированные клетки, экспрессирующие специфические для MAGE-A4 химерные антигенные рецепторы, которые (i) активируются клетками, экспрессирующими MAGE-A4, и/или (ii) проявляют ингибирование роста опухоли у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты множественной миеломы или меланомы человека.

Получение антигенсвязывающих доменов

[0137] Антигенсвязывающие домены химерных антигенных рецепторов по настоящему изобретению, которые специфичны для определенных антигенов (например, MAGE-A4), могут быть получены с помощью любой технологии получения антител, известной в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления один или более отдельных компонентов (например, тяжелых и легких цепей) соответствующих антител по настоящему изобретению получены из химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области техники. Например, одну или более тяжелых и/или легких цепей можно получить с использованием технологии VELOCIMMUNE™. Используя технологию VELOCIMMUNE™ (или любую другую технологию получения человеческих антител), первоначально выделяют химерные антитела с высокой аффинностью к определенному антигену (например, MAGE-A4), имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Антитела охарактеризованы и отобраны по желаемым характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т. д. Как обсуждается в данном документе, эти человеческие переменные области (или CDR) затем могут быть включены в антигенсвязывающие домены химерных антигенных рецепторов.

Полинуклеотиды и векторы [0138] В настоящем изобретении также предложены полинуклеотиды и векторы, кодирующие химерные антигенные рецепторы, обсуждаемые в данном документе. **[0139]** В различных вариантах осуществления полинуклеотид может содержать кассету экспрессии или вектор экспрессии (например, плазмиду для введения в бактериальную клетку-хозяин, или вирусный вектор, такой как бакуловирусный вектор

для трансфекции клетки-хозяина насекомого, или плазмиду или вирусный вектор). вектор, такой как лентивирус, для трансфекции клетки-хозяина млекопитающего). [0140] В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21, или включают молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22. В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 38, или включают молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 39. В различных вариантах осуществления полинуклеотиды и/или векторы содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

Методы конструирования иммунных клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы [0141] В настоящем изобретении предложены способы получения иммунных клеток для иммунотерапии, включающие введение *ex vivo* в такие иммунные клетки полинуклеотидов или векторов, кодирующих один из специфических для MAGE-A4 химерных антигенных рецепторов, описанных в данном документе. [0142] В настоящем изобретении предложены иммунные клетки, содержащие полинуклеотид или лентивирусный вектор, кодирующий один из обсуждаемых в данном документе специфических для MAGE-A4 химерных антигенных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления эти иммунные клетки используются для иммунотерапии (например, для лечения злокачественного новообразования). [0143] В настоящем изобретении предложены способы генетической модификации иммунных клеток, чтобы сделать их более подходящими для аллогенной трансплантации. Согласно первому аспекту иммунная клетка может быть сделана аллогенной, например, путем инактивации по меньшей мере одного гена, экспрессирующего один или более компонентов Т-клеточного рецептора (TCR), как описано в WO 2013/176915, который можно комбинировать с инактивацией гена, кодирующего или регулирующего экспрессию белка HLA или $\beta 2m$. Соответственно, риск синдрома «трансплантат против хозяина» и отторжения трансплантата значительно снижается. Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения, иммунными клетками можно дополнительно манипулировать, чтобы сделать их более активными или ограничить истощение, путем инактивации генов, кодирующих белки, которые действуют как «иммунные контрольные точки», которые действуют как регуляторы активации Т-клеток, такие как PD1 или CTLA-4.

Сконструированные иммунные клетки [0144] Настоящее изобретение также относится к иммунным клеткам (например, сконструированным иммунным клеткам), содержащим химерный антигенный рецептор, как описано в данном документе. В некоторых случаях иммунная клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых случаях иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых случаях

иммунная клетка представляет собой Т-лимфоцит, выбранный из воспалительного Т-лимфоцита, цитотоксического Т-лимфоцита, регуляторного Т-лимфоцита или Т-хелпера. В некоторых случаях иммунная клетка представляет собой цитотоксический CD8+ Т-лимфоцит.

[0145] В некоторых вариантах осуществления сконструированная иммунная клетка представляет собой человеческую Т-клетку, содержащую химерный антигенный рецептор, содержащий от N-конца до С-конца: (a) внеклеточный лиганд-связывающий домен, содержащий домен одноцепочечный вариabельный фрагмент к MAGE-A4 (scFv), содержащий вариabельную область легкой цепи (LCVR) и вариabельную область тяжелой цепи (HCVR); (b) шарнир; (c) трансмембранный домен; и (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен и сигнальный домен.

[0146] В некоторых вариантах осуществления домен scFv сконструированной Т-клетки человека содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2/10. В некоторых вариантах осуществления домен scFv сконструированной Т-клетки человека содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2/37. В некоторых случаях шарнир содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых случаях трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых случаях костимулирующий домен представляет собой костимулирующий домен 4-1BB. В некоторых случаях костимулирующий домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых случаях сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых случаях сигнальный домен CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

[0147] В различных вариантах осуществления сконструированная человеческая Т-клетка содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В различных вариантах осуществления сконструированная человеческая Т-клетка содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

Биоэквиваленты

[0148] В настоящем изобретении предложены химерные антигенные рецепторы и сконструированные клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы, которые имеют аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых иллюстративных молекул, описанных в данном документе, но которые сохраняют способность связывать MAGE-A4, активировать иммунные клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы, в присутствии клеток, экспрессирующих MAGE-A4, или подавлять рост или пролиферацию опухолевых клеток, экспрессирующих MAGE-A4. Такие варианты антитела могут содержать одну или большее количество добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но

проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна таковой описанных биспецифических антигенсвязывающих молекул.

[0149] В одном варианте осуществления две сконструированные иммунные клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению, являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и эффективности.

[0150] В одном из вариантов осуществления две сконструированные иммунные клетки являются биоэквивалентными, если для пациента можно один раз или более чередовать введение препарата сравнения и биологического препарата, не ожидая повышения риска нежелательных эффектов, включая клинически значимые изменения иммуногенности, или снижения эффективности по сравнению с непрерывной терапией без указанного чередования.

[0151] В одном варианте осуществления две сконструированные иммунные клетки являются биоэквивалентными, если они обе действуют посредством одного и того же механизма или механизмов действия для условия или условий применения в той мере, в которой такие механизмы известны.

[0152] Биоэквивалентность может быть продемонстрирована способами *in vivo* и *in vitro*. Варианты оценки биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* с участием людей или на других млекопитающих, в котором измеряют динамику концентрации сконструированной клетки в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости; (b) тест *in vitro*, который был соотнесен с данными о биологической доступности у людей *in vivo* и позволяет в разумных пределах их прогнозировать; (c) тест *in vivo* с участием людей или на других млекопитающих, в котором измеряют динамику соответствующего немедленного фармакологического действия сконструированной клетки (или его мишени); и (d) в хорошо контролируемом клиническом исследовании, в котором устанавливается безопасность, эффективность или биодоступность, или биоэквивалентность сконструированной клетки.

[0153] Биоэквивалентные варианты типичных сконструированных клеток, представленных в данном документе, могут быть сконструированы, например, путем внесения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности.

Видовая селективность и перекрестная реактивность между видами

[0154] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения предоставлены антигенсвязывающие домены, которые связываются с MAGE-A4 человека, но не с MAGE-A4 других видов. В настоящем изобретении также представлены антигенсвязывающие домены, которые связываются с MAGE-A4 человека и с MAGE-A4 одного или более отличных от человека видов. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению связываются с MAGE-A4 286-294 или 230-239. В некоторых вариантах осуществления MAGE-A4, с

которым связывается антигенсвязывающий домен (например, MAGE-A4 286-294 или 230-239), презентирован на поверхности клетки с помощью HLA, например, HLA-A2.

[0155] В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения предложены антигенсвязывающие домены, которые связываются с MAGE-A4 человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одним или более из MAGE-A4 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макаки-резуса или шимпанзе. Более того, связывание с MAGE-A4 может происходить в контексте презентуемого МНС MAGE-A4, такого как презентуемого HLA MAGE-A4. Примером презентуемого HLA MAGE-A4 является связанный с HLA-A2 MAGE-A4 человека.

Активация и экспансия сконструированных иммунных клеток [0156]

Независимо от того, до или после генетической модификации сконструированных клеток (например, Т-клеток), даже если генетически модифицированные иммунные клетки по настоящему изобретению активируются и пролиферируют независимо от механизмов связывания антигена, иммунные клетки, особенно Т-клетки по настоящему изобретению могут быть дополнительно активированы и размножены, как правило, с использованием способов, как описано, например, в патентах США №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041; и публикации патентной заявки США № 20060121005. Т-клетки можно размножать *in vitro* или *in vivo*. **[0157]** Как правило, Т-клетки по настоящему изобретению размножаются при приведении в контакт с агентом, который стимулирует комплекс CD3 TCR и костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток, чтобы создать сигнал активации для Т-клетки. Например, химические вещества, такие как ионофор кальция А23187, форбол 12-миристанат 13-ацетат (РМА) или митогенные лектины, такие как фитогемагглютинин (РНА), могут использоваться для создания сигнала активации для Т-клетки. **[0158]** В качестве неограничивающих примеров можно стимулировать популяции Т-клеток *in vitro*, например, путем приведения в контакт с антителом к CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом к CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем приведения в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в комбинации с ионофором кальция. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используется лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Условия, подходящие для культуры Т-клеток, включают подходящие среды (например, минимальные питательные среды или среды RPMI 1640 или X-vivo 5 (Lonza)), которые могут содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, эмбриональную бычью или человеческую сыворотку), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN-g, 1L-4, 1L-7, GM-CSF, IL-10, IL-2, 1L-15, TGFp, и TNF-α или любые другие добавки для роста клеток

известны специалисту в данной области техники. Другие добавки для роста клеток включают, но не ограничиваются ими, сурфактант, плазманат и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среды могут включать RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 1, и X-Vivo 20, Optimizer, с добавлением аминокислот, пирувата натрия и витаминов, или без сыворотки, или с добавлением соответствующего количества сыворотки (или плазмы) или определенного набора гормонов и/или количества цитокинов, достаточного для роста и экспансии T-клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры, а не в культуры клеток, которые должны быть введены субъекту. Целевые клетки поддерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, например, при подходящей температуре (например, 37 °C) и атмосфере (например, воздух плюс 5% O₂). T-клетки, которые подвергали стимуляции в течение различных периодов времени, могут обладать различными характеристиками. [0159] В некоторых вариантах осуществления клетки можно размножать путем совместного культивирования с тканью или клетками. Клетки также могут быть размножены *in vivo*, например, в крови субъекта после введения указанной клетки субъекту.

Терапевтическое применение [0160] В настоящем изобретении предложены композиции, содержащие сконструированную клетку (например, T-клетку), экспрессирующую химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых случаях сконструированные клетки образуют лекарственный препарат, особенно для иммунотерапии. В некоторых случаях сконструированные клетки используются для лечения злокачественного новообразования (например, множественной миеломы или меланомы). В некоторых случаях сконструированные клетки используются в производстве лекарственного препарата для иммунотерапии и/или лечения злокачественного новообразования (например, злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4). [0161] В настоящем изобретении предложены способы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей сконструированную клетку (например, T-клетку), экспрессирующую химерный антигенный рецептор, как обсуждается в данном документе. Терапевтическая композиция может содержать клетку, экспрессирующую любой химерный антигенный рецептор, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель. Используемое в данном документе выражение «субъект, нуждающийся в этом» означает человека или животное, отличное от человека, у которого проявляются один или более симптомов или признаков злокачественного новообразования (например, субъект с опухолью, экспрессирующей MAGE-A4, или страдающий каким-либо из злокачественных новообразований, упомянутых в данном документе), или которым иным образом было бы полезно ингибирование или снижение активности MAGE-A4 или истощение MAGE-A4+ клеток.

[0162] Сконструированные клетки по настоящему изобретению могут быть

полезны, среди прочего, для лечения любого заболевания или нарушения, при котором стимуляция, активация и/или нацеливание иммунного ответа были бы полезными. В частности, сконструированные клетки по настоящему изобретению можно использовать для лечения, профилактики и/или облегчения любого заболевания или нарушения, связанного или опосредованного экспрессией или активностью MAGE-A4 или пролиферацией MAGE-A4+ клеток. Клетки, экспрессирующие MAGE-A4, которые можно ингибировать или уничтожить с использованием сконструированных клеток по настоящему изобретению, включают, например, клетки множественной миеломы, клетки меланомы или другие клетки солидных опухолей.

[0163] Сконструированные клетки согласно настоящему изобретению можно использовать для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией MAGE-A4, включая, например, злокачественного новообразования, включая, помимо прочего, множественную миелому, синовиальную саркому, рак пищевода, рак головы и шеи, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак матки, рак желудка, рак шейки матки, рак молочной железы и меланому. Сконструированные клетки по настоящему изобретению, как правило, можно использовать для лечения опухоли, экспрессирующей MAGE-A4. В соответствии с другими родственными вариантами осуществления настоящего изобретения предложены способы, включающие введение сконструированной клетки, как раскрыто в данном документе, пациенту, имеющему опухоль, экспрессирующую MAGE-A4, включая опухоли из злокачественных новообразований, перечисленных выше. Аналитические/диагностические способы, известные в данной области техники, такие как сканирование опухоли и т. д., могут быть использованы для установления наличия у пациента такой опухоли, заболевания или патологического состояния.

[0164] Настоящее изобретение также обеспечивает способы лечения остаточной опухоли у субъекта. В контексте настоящего документа термин «остаточный рак» означает наличие или сохранение одной или более раковых клеток у субъекта после проведения противораковой терапии.

[0165] В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией MAGE-A4 (например, злокачественного новообразования), включающие введение субъекту популяции сконструированных клеток, описанных в других разделах данного документа, после того, как у субъекта было установлено наличие заболевания или нарушения. Например, настоящее изобретение обеспечивает способы лечения заболевания или нарушения, включающие введение сконструированных иммунных клеток пациенту через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или более после того, как субъект получил другую иммунотерапию или химиотерапию. **[0166]** Обсуждаемые в данном документе способы лечения могут быть уменьшающими интенсивность заболевания, лечебными или профилактическими. Способ лечения может быть либо частью

аутологичной иммунотерапии, либо частью аллогенной иммунотерапии. Под аутологичными подразумевается, что клетки, линия клеток или популяция клеток, используемые для лечения пациентов, получены от пациента или от донора, совместимого с человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA). Под аллогенным подразумевается, что клетки, линия клеток или популяция клеток, используемые для лечения пациентов, происходят не от пациента, а от донора. [0167] В данном документе описаны клетки, которые можно использовать с описанными способами. Лечение можно использовать для лечения пациентов, у которых диагностировано предзлокачественное или злокачественное раковое состояние, характеризующееся наличием клеток, экспрессирующих MAGE-A4, особенно избытком клеток, экспрессирующих MAGE-A4. Такие патологические состояния можно обнаружить при злокачественном новообразовании. [0168] Типы злокачественных новообразований, подлежащих лечению с помощью сконструированных клеток по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, множественную миелому, синовиальную саркому, рак пищевода, рак головы и шеи, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак матки, рак желудка, рак шейки матки, рак молочной железы и меланому.

[0169] Композиции и способы по настоящему изобретению могут использоваться для лечения субъекта, который был охарактеризован как имеющий клетки или ткани, экспрессирующие MAGE-A4, или подозреваемый в наличии клеток или тканей, экспрессирующих MAGE-A4. Например, субъекты, получающие пользу от лечения согласно настоящему изобретению, включают субъектов с множественной миеломой, синовиальной саркомой, раком пищевода, раком головы и шеи, раком легкого, раком мочевого пузыря, раком яичников, раком матки, раком желудка, раком шейки матки, раком молочной железы или меланомой.

[0170] Введение клеток или популяции клеток согласно настоящему изобретению может осуществляться любым удобным способом, включая ингаляцию аэрозолем, инъекцию, пероральное поступление, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Описанные в данном документе композиции можно вводить пациенту подкожно, внутривожно, внутриопухолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной или внутрелимфатической инъекции или внутрибрюшинно. В одном варианте осуществления композиции клеток по настоящему изобретению предпочтительно вводят при помощи внутривенной инъекции.

[0171] Введение клеток или популяции клеток может состоять из введения 10^4 - 10^9 клеток на кг массы тела, предпочтительно от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целые значения числа клеток в этих диапазонах. Клетки или популяция клеток можно вводить в одной или более дозах. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество клеток вводят в виде разовой дозы. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество клеток вводят в виде более чем одной дозы в течение определенного периода времени. Время введения определяется лечащим врачом и зависит от клинического состояния пациента. Клетки или популяция клеток могут быть получены

из любого источника, такого как банк крови или донор. Хотя индивидуальные потребности меняются, определение диапазонов эффективных количеств клеток данного типа для конкретного заболевания или патологического состояния находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Эффективное количество означает количество, которое обеспечивает терапевтический или профилактический эффект. Вводимая доза будет зависеть от возраста, состояния здоровья и массы реципиента, вида сопутствующего лечения, если таковое имеется, частоты лечения и характера желаемого эффекта.

[0172] В одном варианте осуществления эффективное количество клеток или композиции, содержащей эти клетки, вводят парентерально. Это введение может представлять собой внутривенное введение. В некоторых случаях введение может осуществляться непосредственно путем инъекции внутрь опухоли.

[0173] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки вводят пациенту в сочетании (например, до, одновременно или после) с любым количеством подходящих способов лечения, включая, помимо прочего, лечение такими агентами, как противовирусная терапия, лечение цидофовиром и интерлейкином-2, цитарабином (также известным как ARA-C) или натализумабом для пациентов с рассеянным склерозом, или лечение эфализтимабом для пациентов с псориазом, или другие виды лечения для пациентов с ПМЛ. В дополнительных вариантах осуществления Т-клетки согласно настоящему изобретению можно использовать в комбинации с химиотерапией, облучением, иммунодепрессантами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антителами или другими иммуноаблативными средствами, такими как САМРАТН, антитела к CD3 или другие терапевтические средства на основе антител, цитоксин, флударибин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микоплиеноловая кислота, стероиды, FR901228, цитокины, и радиоактивным излучением.

[0174] В дополнительном варианте осуществления композиции клеток по настоящему изобретению вводят пациенту в сочетании с (например, до, одновременно или после) трансплантацией костного мозга, абляционной терапией Т-клеток с использованием химиотерапевтических агентов, таких как флударабин, наружная дистанционная лучевая терапия (XRT), циклофосфамид или антитела, такие как ОКТ3 или САМРАТН. В еще одном варианте осуществления композиции клеток по настоящему изобретению вводят после абляционной терапии В-клеток, такой как агенты, которые реагируют с CD20, например, ритуксан. Например, в одном варианте осуществления субъекты могут проходить стандартное лечение с применением высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых вариантах осуществления после трансплантации субъекты получают инфузию размноженных иммунных клеток согласно настоящему изобретению. В дополнительном варианте осуществления размноженные клетки вводят до операции или после нее. В некоторых вариантах осуществления любые средства (например,

хирургическое вмешательство, химиотерапия или лучевая терапия) могут использоваться для уменьшения опухолевой нагрузки до введения размноженных иммунных клеток согласно настоящему изобретению. В одном варианте осуществления уменьшение опухолевой нагрузки перед введением сконструированных клеток согласно настоящему изобретению может снизить вероятность или предотвратить синдром высвобождения цитокинов или цитокиновый шторм, побочный эффект, который может быть связан с терапией CAR T-клетками.

Комбинированные виды терапии

[0175] В настоящем изобретении предложены способы, которые включают введение сконструированных клеток или популяции клеток, содержащих любой из химерных антигенных рецепторов, описанных в данном документе, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами. Примеры дополнительных терапевтических агентов, которые можно комбинировать или вводить в комбинации с клетками или популяцией клеток по настоящему изобретению, включают, например, противоопухолевый агент (например, химиотерапевтические агенты, включая мелфалан, винкристин (Oncovin), циклофосфамид (Cytoxan), этопозид (VP-16), доксорубин (адриамицин), липосомальный доксорубин (Doxil), обендамустин (Treanda) или любые другие препараты, которые, как известно, эффективны при лечении опухоли из плазматических клеток у субъекта). В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент содержит стероиды. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент содержит целевые терапевтические агенты, включая талидомид, леналидомид и бортезомиб, которые являются терапевтическими препаратами, одобренными для лечения пациентов с впервые выявленным диагнозом. Например, леналидомид, помалидомид, бортезомиб, карфилзомиб, панобиностат, иксазомиб, элутузумаб и даратумумаб являются примерами второго терапевтического агента, эффективного для лечения рецидивирующей миеломы. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент относится к схеме, включающей в себя лучевую терапию или трансплантацию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент может представлять собой иммуномодулирующий агент. В отдельных вариантах осуществления второй терапевтический агент может представлять собой ингибитор протеасом, включая бортезомиб (Velcade®), карфилзомиб (Kyprolis®), иксазомиб (Ninlaro®). В отдельных вариантах осуществления второй терапевтический агент может представлять собой ингибитор гистондеацетилазы, такой как панобиностат (Farydak®). В некоторых вариантах осуществления, второй терапевтический агент может представлять собой моноклональное антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство, биспецифическое антитело, конъюгированное с противоопухолевым агентом, ингибитор контрольной точки, или их комбинации. Другие агенты, которые можно с пользой вводить в комбинации с антигенсвязывающими молекулами согласно настоящему изобретению, включают в себя ингибиторы цитокинов, включая в себя ингибиторы цитокинов-малых

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

[0176] Настоящее изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любую из сконструированных клеток или популяций клеток, упомянутых в данном документе, и ингибитор одного или более из VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, Tmprss2, MSLN, CA9, уроплакина или любого из вышеупомянутых цитокинов, причем ингибитор представляет собой аптамер, бессмысловую молекулу, рибозим, миРНК, пептидное антитело, наноантитело или фрагмент антитела (например, фрагмент Fab; фрагмент F(ab')₂; фрагмент Fd; фрагмент Fv; scFv; фрагмент dAb; или другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела, миниантитела и минимальные единицы распознавания). В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки или популяция клеток по настоящему изобретению также можно вводить в качестве схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или традиционную химиотерапию.

[0177] Дополнительный терапевтически активный компонент(-ы) можно вводить непосредственно перед, одновременно с или вскоре после введения сконструированных клеток по настоящему изобретению; (для целей настоящего изобретения такие схемы введения считаются введением сконструированных клеток «в сочетании с» дополнительным терапевтически активным компонентом).

[0178] Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, в которых сконструированная клетка или популяция клеток по настоящему изобретению

объединены в состав с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в другом месте настоящего документа.

Схемы введения

[0179] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения субъекту можно вводить несколько доз сконструированных клеток в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту включают последовательное введение субъекту множества доз клеток. В контексте данного документа, «последовательное введение» подразумевает то, что каждую дозу вводят субъекту в другой момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). В настоящем изобретении предложены способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы, за которой следует одна или более вторичных доз и, необязательно, следует одна или более третичных доз.

[0180] Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения сконструированных клеток по настоящему изобретению. Таким образом, «начальная доза» представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называемую «исходной дозой»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество сконструированных клеток, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Однако в некоторых вариантах осуществления количество сконструированных клеток, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (например, регулируется в большую или меньшую сторону) в течение курса лечения. В некоторых вариантах осуществления, две или большее количество (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводятся в начале схемы лечения в виде «нагрузочных доз», за которыми следуют последующие дозы, которые вводятся реже (например, «поддерживающие дозы»).

[0181] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения, каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, через 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или больше) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно предшествующая доза» в контексте данного документа означает, в последовательности многократных введений, дозу, которую вводят пациенту до введения непосредственно следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

[0182] Способы в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз. Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну

вторичную дозу. В других вариантах осуществления, пациенту вводят две или большее количество (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или большее количество) вторичных доз. Аналогично, в определенных вариантах осуществления, пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления, пациенту вводят две или большее количество (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или большее количество) третичных доз.

[0183] В вариантах осуществления, включающих в себя множественные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может быть введена субъекту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом, в вариантах реализации, включающих введение многократных третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. В качестве альтернативы частота, с которой субъекту вводят вторичные и/или третичные дозы, может варьировать в течение курса лечения. Частота введения также может корректироваться лечащим врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

ПРИМЕРЫ

[0184] Следующие примеры приведены для того, чтобы в полной мере раскрыть и описать для специалистов в данной области техники способы получения и применение способов и композиций согласно настоящему изобретению, и не ограничивают объем информации, которую авторы рассматривают в качестве изобретения. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т. д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, то доли соответствуют массовым долям, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура указана в градусах Цельсия, и давление, которое равно или практически равно атмосферному.

Пример 1. Получение антител к MAGE-A4

[0185] Антитела к MAGE-A4 получали путем иммунизации генетически модифицированной мыши (например, сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека) антигеном MAGE-A4 человека (например, hMAGE-A4 230-239 для mAb31345 или hMAGE-A4 286-294 для mAb33229) и HLA-A2.

[0186] После иммунизации у каждой мыши отбирали спленоциты и либо (1) сливали с клетками мышиной миеломы для сохранения их жизнеспособности и образования гибридомных клеток и подвергали скринингу на специфичность к MAGE-A4, либо (2) сортировали В-клетки (как описано в публикации патента США № 2007/0280945A1) с использованием фрагмента MAGE-A4 человека в качестве реагента для сортировки, который связывает и идентифицирует реактивные антитела (антиген-положительные В-клетки).

[0187] Первоначально были выделены химерные антитела к MAGE-A4, имеющие переменную область человека и константную область мыши. Антитела были охарактеризованы и отобраны по желаемым характеристикам, включая аффинность, селективность и т. д. При необходимости константные области мыши заменяли желаемой константной областью человека, например, константной областью IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4, для создания полностью человеческого антитела к MAGE-A4. В то время как выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики связывания антигена с высокой аффинностью и специфичностью в отношении мишени находятся в переменной области.

[0188] **Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей антител к MAGE-A4:** В Таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, и CDR выбранных антител к MAGE-A4 согласно настоящему изобретению. Последовательности mAb31345 и mAb31345* в таблице 1 идентичны, за исключением одной дополнительной С-концевой аминокислоты в последовательности «названной» LCVR mAb31345* (т. е. полноразмерные антитела идентичны, но одна дополнительная аминокислота была отнесена к LCVR mAb31345* при аннотировании области LCVR). Соответствующие идентификаторы нуклеотидных последовательностей представлены в таблице 2. Краткое описание всех последовательностей, включенных в данный документ, представлена в Таблице 56.

Таблица 1: Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb31345	2	4	6	8	37	12	14	16
mAb31345*	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb33229	51	53	55	57	59	61	63	65

Таблица 2: Идентификаторы нуклеотидных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb31345	1	3	5	7	36	11	13	15
mAb31345*	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb33229	50	52	54	56	58	60	62	64

Пример 2: Создание специфических для MAGE-A4 химерных антигенных рецепторов

[0189] Антитела к MAGE-A4 31345 и 33229 из Таблицы 1 были переформатированы в одноцепочечный варибельный фрагмент VL-VH (ScFv) и помещены в конструкцию химерного антигенного рецептора (CAR), в которой использовался шарнирный и трансмембранный домен CD8 α , костимулирующий домен 4-1BB и стимулирующий домен CD3-дзета или шарнирный, трансмембранный и сигнальный домен CD28 с использованием нуклеотидных последовательностей HCVR и LCVR антитела к MAGE-A4, соответствующего SEQ ID NO: 1 и 36, соответственно. Полноразмерные последовательности нуклеиновой кислоты и полипептидной тяжелой цепи соответствующего антитела к MAGE-A4 31345 соответствуют SEQ ID NO: 17 и 18, соответственно. Полноразмерные последовательности нуклеиновой кислоты и полипептидной легкой цепи соответствующего антитела к MAGE-A4 31345 соответствуют SEQ ID NO: 19 и 20, соответственно. Последовательности полноразмерной нуклеиновой кислоты и полипептида CAR 31345, нацеленного на HLA-A2/MAGE-A4286-294, соответствуют SEQ ID NO: 38 и 39, соответственно. В качестве несвязывающего контроля подобный CAR был сконструирован с использованием нуклеотидной последовательности нерелевантного scFv (конструкция CAR SEQ ID NO: 34; полипептидная последовательность контрольного CAR соответствует SEQ ID NO: 35). Специфический для MAGE-A4 CAR был клонирован в лентивирусный вектор экспрессии (Lenti-X™ Bicistronic Expression System (Neo), Clontech, кат. № 632181), и лентивирусные частицы были созданы с помощью системы Lenti-X Packaging Single-Shot (VSV-G) (Clontech, кат. № 631276) в соответствии с протоколами производителя. Клетки Jurkat, сконструированные для экспрессии репортера NFkB-зависимой люциферазы (Jurkat/NKFBLuc cl 1C11), затем трансдуцировали конструкцией CAR с использованием чашек Петри с предварительно нанесенным покрытием RetroNectin® (Clontech, кат. № T110a) в соответствии с протоколами производителя. После селекции в течение по меньшей мере 2 недель в 500 мкг/мл G418 (Gibco, кат. № 11811-098) была получена следующая линия CAR T-клеток; Jurkat/NKFBLuc cl 1C11/MAGE-A4 (286-294) 31345 VL-VH CART. В качестве несвязывающего контроля подобный CAR был сконструирован с использованием нуклеотидной последовательности нерелевантного scFv. Эту линию CAR T-клеток оценивали на экспрессию на клеточной поверхности и функциональную активность в ответ на клетки, экспрессирующие MAGE-A4.

Пример 3: Экспрессия на клеточной поверхности конструкций CAR к MAGE-A4 в клетках Jurkat и активация T-клеток с CAR к MAGE-A4

[0190] Относительный уровень экспрессии конструкции CAR к MAGE-A4 на клеточной поверхности в клетках Jurkat/Jurkat/NKFBLuc оценивали с помощью проточной цитометрии. Для окрашивания клетки помещали в буфер для окрашивания PBS без кальция и магния (Irving 9240) и 2% FBS (ATCC 30-2020) при плотности 200000 клеток на лунку в 96-луночном планшете с V-образным дном и окрашивали в течение 30 минут при 4°C с 10 мкг/мл белка L (Genscript Biotin Protein L). После инкубации клетки промывали один раз в буфере для окрашивания и окрашивали вторичным антителом к стрептавидину

Alexa-647 (Biolegend) при 0,5 мкг/мл в течение 30 минут при 4 °С. Затем клетки промывали и фиксировали, используя 50% раствор BD Cytotfix (Becton Dickinson), разбавленный в буфере для окрашивания. Образцы обрабатывали на проточном цитометре Intellicyt iQue и анализировали с помощью FlowJo 10.2 для расчета средней интенсивности флуоресценции (MFI). Процент клеток, положительных по белку L (таблица 3), рассчитывали, взяв процент клеток, положительных по белку L, по отношению к общему количеству клеток.

[0191] Активность линий CAR Т-клеток оценивали с помощью биоанализа CAR Т/АРС (антигенпрезентирующая клетка). Для проведения биоанализа 50000 CAR Т-клеток добавляли в 96-луночные белые планшеты Thermo-Nunc (Thermo Fisher Scientific) в 50 мкл среды для анализа (среда RPMI с 10% FBS и 1% P/S/G) с последующим добавлением 3-кратного серийного разведения APC (от 500000 клеток до 685 клеток) в 50 мкл среды для анализа. Были использованы следующие APC: IM9 (которые эндогенно экспрессируют пептид MAGE-A4 286-294) и HEK293 (которые являются отрицательными в отношении MAGE-A4 286-294). Смеси клеток инкубировали в термостате с контролем влажности при 37 °С, 5% CO₂ в течение 5 часов. Активность NFκB-зависимой люциферазы измеряли с использованием Promega One-Glo и планшет-ридера Perkin Elmer Envision. Относительные единицы люциферазы (RLU) были созданы и нанесены на график в GraphPad Prism с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 8-точечной кривой ответа. Также в анализ включали условие отсутствия обработки APC для каждой кривой доза-ответ в виде продолжения трехкратного серийного разведения и оно представлено как наименьшая доза. Максимальную активность CAR Т определяли, взяв отношение самого высокого RLU на кривой к самому низкому, и оно представлено в таблице 4 как сигнал: шум (S: N). Результаты окрашивания белком L и активации Т-клеток с CAR к MAGE-A4 показаны в таблицах 3 и 4.

Таблица 3: Окрашивание белком L CAR в клетках Jurkat/NFKBLuc cl 1C11

Линия клеток	% Положительных по белку L
Jurkat/NFKBLuc cl. 1C11	3,9
Jurkat/NFKBLuc cl. 1C11/ MAGE-A4 (286-294) 31345 VL-VH CAR Т-клетки	49,9
Jurkat/NFKBLuc cl. 1C11/Контрольные VL-VH CAR Т-клетки	67,2

[0192] В таблице 3 показан процент CAR-положительных клеток Jurkat/NFKBLuc, измеренный путем окрашивания белком L. Специфический для MAGE-A4 CAR, полученный из mAb31345, экспрессировался в 49,9% клеток, в то время как ненацеливающий контроль CAR был экспрессирован в 67,2% клеток, а экспрессия CAR была обнаружена только в 3,9% отрицательных контрольных (Jurkat/NFKBLuc cl. 1C11) клеток.

Таблица 4: Активация Т-клеток с CAR к MAGE-A4 в биоанализе CAR Т-клеток/APC

Антигенпрезентирующая клетка	Максимальная активность CAR Т-клеток (сигнал: шум)		
	Исходная клетка	CAR 31345 к MAGE-A4 (286-294)	Контрольный CAR
IM9	5,2	35,0	4,9
HEK293	1,0	0,9	0,8

[0193] В Таблице 4 показано, что линия Т-клеток с CAR HLA-A2:MAGE-A4 (286-294) 31345 была активирована клетками IM9 с отношением сигнал/шум 35,0, в то время как линия Т-клеток с CAR HLA-A2: MAGE-A4 (286-294) не активировалась линией клеток отрицательного контроля HEK 293.

Пример 4. Получение CAR Т-клеток, экспрессирующих Специфический для MAGE-A4 CAR

[0194] CAR из Примера 2 (содержащий VL-VH scFv к MAGE-A4, трансмембранный домен huCD8, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета были сконструированы с использованием нуклеотидных последовательностей HCVR и LCVR антитела к MAGE-A4, соответствующего SEQ ID NO: 1 и 36, соответственно) и несвязывающий контрольный CAR из Примера 2 (конструкция CAR из SEQ ID NO: 34; полипептидная последовательность контрольного CAR соответствует SEQ ID NO: 35) были клонированы в лентивирусный вектор pLVX с промотором EF1a и IRES: последовательность eGFP (для отслеживания клеток, трансдуцированных CAR), и был получен лентивирус с псевдотипом VSV. Затем CD3+ Т-клетки выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), стимулировали микрочастицами с CD3/CD28 и 100 Ед/мл рекомбинантного человеческого IL-2, и трансдуцировали лентивирусом при MOI=5. Трансдуцированные клетки размножали в течение 19 дней с помощью микрочастиц с CD3/CD28 и 100 Ед/мл рекомбинантного человеческого IL-2 перед криоконсервацией до применения в экспериментах *in vivo*. Эти линии CAR Т-клеток использовали для оценки цитотоксичности *in vitro* и эффективности снижения опухолевой нагрузки *in vivo*.

Пример 5: MAGE-A4-специфические CAR Т-клетки опосредуют цитолитический анализ клеток, экспрессирующих MAGE-A4

[0195] CD3+ Т-клетки выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), стимулировали микрочастицами с CD3/CD28 и 100 Ед/мл рекомбинантного человеческого IL-2, и трансдуцировали лентивирусом при MOI=5, как описано выше. Трансдуцированные клетки размножали в течение 19 дней с использованием микрочастиц с CD3/CD28 и 100 Ед/мл рекомбинантного человеческого IL-2 перед проведением цитолитического анализа.

[0196] Для определения цитолитической способности Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), нацеленным на MAGE-A4, проводили цитолитический анализ с использованием увеличенных CAR Т-клеток и различных линий опухолевых клеток-мишеней, которые экспрессируют различные уровни MAGE-A4. На 19 день размножения размноженные CAR Т-клетки совместно культивировали в трех повторностях в различных соотношениях с мечеными кальцеином MAGE-A4+ линиями клеток-мишеней или контрольными линиями клеток. Кальцеин представляет собой проникающий в клетки флуоресцентный краситель с длинами волн возбуждения и излучения 495 и 515 нм, соответственно. Через 2,5 часа процент цитотоксичности был рассчитан на основе количества кальцеинового красителя, высвобожденного из клеток-мишеней, что происходит при нарушении целостности мембраны, как ((сигнал кальцеина - спонтанное высвобождение кальцеина) / (максимальное высвобождение кальцеина - спонтанное высвобождение кальцеина))*100. Для определения максимального высвобождения кальцеина клетки-мишени обрабатывали 1% раствором детергента Triton-X-114 в ходе анализа. Для определения спонтанного высвобождения кальцеина MAGE-A4+ клетки-мишени метили кальцеином и затем культивировали в отсутствие CAR Т-клеток.

[0197] 2-часовой анализ цитотоксичности кальцеина: При сборе размножающиеся CAR Т-клетки промывали и ресуспендировали в среде для культивирования клеток Optimizer. Каждую линию клеток-мишеней собирали и ресуспендировали при плотности 2×10^6 /мл перед добавлением красителя кальцеин-AM в концентрации 8 мкМ в течение 35 минут при 37 °С. После мечения кальцеином клетки-мишени дважды промывали для удаления лишнего кальцеина. Затем Т-клетки и клетки-мишени совместно культивировали на 96-луночном круглодонном планшете при различных соотношениях и культивировали при 37°С в течение 2,5 часов, после чего собирали культуральный супернатант. Для отрицательного контроля клетки-мишени культивировали совместно с Т-клетками, полученными с использованием аналогичного CAR, сконструированного таким образом, чтобы содержать нерелевантный scFv, который не распознает MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄, связанный с HLA-A2. Этот контроль CAR scFv представлял собой scFv к HLA-A2/HPV16E7 (11-19) (в ориентации VL-VH). Lentivirus использовали в качестве вектора для введения scFv в клетки. В качестве отрицательного контроля CAR использовали нетрансдуцированные и размноженные Т-клетки от одного и того же нормального здорового донора. В качестве контроля опосредованного антиген-специфическими CAR Т-клетками уничтожения использовали линию клеток эмбриональной почки человека 293Т, экспрессирующую антиген SV40, поскольку эта линия клеток является отрицательной по экспрессии MAGE-A4. Чтобы определить, высвобождается ли кальцеин спонтанно из MAGE-A4+ линий клеток-мишеней, каждую линию клеток культивировали в отсутствие CAR Т-клеток. Чтобы определить максимально возможное высвобождение кальцеина, линии клеток-мишеней культивировали и лизировали с использованием среды Optimizer, которая была дополнена 1% детергентом Triton™ X-114. В супернатанте

относительные уровни кальцеина измеряли с использованием планшет-ридера Viktor X4, и процент цитотоксичности рассчитывали как ((сигнал кальцеина - спонтанное высвобождение кальцеина) / (максимальное высвобождение кальцеина - спонтанное высвобождение кальцеина))*100.

[0198] Линии клеток, используемые для этого анализа, включали следующее: линия опухолевых клеток меланомы человека A375 (ATCC®, номер линии клеток: CRL-9068™), линия клеток опухоли меланомы человека A375 (ATCC, номер линии клеток: CRL-9068™), сконструированная для сверхэкспрессии HLA-A2, нагруженным пептидом MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄, линия клеток множественной миеломы IM9 (DSMZ, кат. №: ACC569), линия клеток множественной миеломы IM9 (DSMZ, кат. №: ACC569™), сконструированная для сверхэкспрессии HLA-A2, нагруженная пептидом MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄, линия клеток эмбриональной почки человека 293T, экспрессирующая антиген SV40 (ATCC®, номер линии клеток: CRL-3216™), и эпидермоидная карцинома шейки матки CaSKI (ATCC® CRL-1550™), сконструированная для сверхэкспрессии HLA-A2, нагруженным пептидом HPV16E7₁₁₋₁₉.

[0199] Как показано на **Фиг. 2А** и **Фиг. 2В** и в Таблицах 5, 6 и 7, культуры, состоящие из направленных HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ CAR+ Т-клеток, используемых с использованием индуцированных scFv 31345 клеток A375 (**Фиг. 2А**: черные кружки, пунктирная линия), клетки A375, сверхэкспрессирующие HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ (**Фиг. 2А**: черные кружки, сплошная линия, обозначены как A375 ++), клеток IM9 (**Фиг. 2В**: черные кружки, пунктирная линия) и клеток IM9, сверхэкспрессирующих HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ (**Фиг. 2В**: черные кружки, сплошная линия, обозначены как IM9++). По сравнению с клетками A375 более высокий уровень цитотоксичности наблюдали в отношении эндогенных клеток IM9. Сверхэкспрессия HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ в клетках A375 не повышала уровень цитотоксичности по сравнению с эндогенными клетками A375. Не желая быть связанными теорией, этот результат может быть связан с тем, что клетки IM9 экспрессируют более высокие уровни антигена MAGE-A4, чем клетки A375.

Таблица 5: Направленный HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ цитолиз CAR Т-клеток

Соотноше ние CAR Т-клетка: клетка- мишень	Клетка-мишень							
	A375		A375++		IM9		IM9++	
	Среднее значение	Станд. откл.						
50	23,5	2,6	28,6	1,1	38,0	0,5	64,9	0,6
25	14,1	0,4	15,5	1,1	24,1	1,4	50,8	0,7
12,5	7,0	1,6	4,9	1,4	15,0	2,1	38,1	1,0

6,25	2,1	1,2	2,2	4,4	9,0	1,3	25,2	0,1
3,125	0,8	0,7	-3,7	0,8	5,3	1,5	13,4	1,4
1,5625	-2,2	1,0	-5,7	1,3	2,6	2,2	6,7	0,8
0,78125	-1,4	1,0	-3,2	2,5	2,1	2,0	3,7	0,3
0	-1,9	0,9	-7,5	1,1	1,3	1,3	-0,5	0,1

Станд. откл.: стандартное отклонение

Таблица 6: Направленный HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ цитолиз CAR T-клеток, планшет 1

Соотношение CAR T-клетка: клетка-мишень	Клетка-мишень											
	293T		HPV-293T		HPV-A375		HPV-A375++		MOI 0 A375		MOI 0 A375++	
50:1	Среднее значение	Станд. откл.										
		0,9	1,7	-2,1	1,6	2,3	2,8	-2,6	1,2	8,6	2,9	2,8

Станд. откл.: стандартное отклонение

Таблица 7: Направленный HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ цитолиз CAR T-клеток, планшет 2

Соотношение CAR T-клетка: клетка-мишень	293T	HPV-293T	HPV-IM9	HPV-A375++	MOI 0 A375	MOI 0 A375++

50:1	Среднее значение	Станд. откл.										
	0,9	1,7	-2,1	1,6	2,3	2,8	-2,6	1,2	8,6	2,9	2,8	1,7

Станд. откл.: стандартное отклонение

[0200] Как видно в Таблицы 5, 6 и 7, нетрансдуцированные и размноженные (MOI 0) Т-клетки, а также CAR Т-клетки, экспрессирующие CAR, неспецифический для MAGE-A4, при совместном культивировании с MAGE-A4+ клетками-мишенями (A375, A375++, IM9, IM9++) даже при максимальном соотношении 50 Т-клеток к одной клетке-мишени не удалось вызвать значительного цитолиза клеток-мишеней по сравнению с MAGE-A4+ опухолевыми клетками. Эти результаты демонстрируют, что цитолиз наблюдается только тогда, когда структура CAR содержит scFv 31345, распознающий HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄. Кроме того, нацеленные на HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ CAR Т-клетки-мишени продемонстрировали незначительную цитотоксичность в отношении клеток 293Т, в которых отсутствует экспрессия MAGE-A4, указывающая на то, что экспрессия MAGE-A4 необходима для наблюдения цитолиза.

Пример 6. Нацеленные на MAGE-A4 Т-клетки CAR снижают рост опухолей, экспрессирующих MAGE-A4, in vivo в ксеногенной модели меланомы

[0201] Для определения in vivo эффективности Т-клеток с нацеленным на HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ химерным антигенным рецептором (CAR) было проведено исследование ксеногенной опухоли на мышах с использованием опухолевых клеток меланомы человека A375, которые экспрессируют MAGE-A4. На 0 день иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) подкожно инъецировали 5×10^6 опухолевых клеток человеческой меланомы HLA-A2⁺MAGE-A4⁺ A375. На 10 день эксперимента, после того как опухоли имели достаточно времени, чтобы сформироваться, мышам внутривенно вводили 4×10^6 Т-клеток, которые экспрессируют либо контрольный CAR (анти-HLA-A2/HPV16E7₁₁₋₁₉ scFv в ориентации VL-VH) или анти-HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ CAR (как определено по частоте клеток, экспрессирующих GFP, который является маркером для тех клеток, которые были трансдуцированы CAR). В частности, у мышей (n=5 на группу) вводили либо 4×10^6 нерелевантных scFc CAR Т-клеток (контроль ScFv CAR) или 4×10^6 анти-MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ CAR Т, кодирующие 31345 ScFv CAR. Рост опухоли оценивали в течение 52 дней путем измерения объемов опухоли.

[0202] Для определения объема опухолей с помощью наружного штангенциркуля определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объемы опухолей исходя из измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле: Объем (мм³)=(длина x ширина²)/2.

Таблица 8. Направленные на HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ CAR T-клетки снижают рост опухоли

День	Лечение CAR T-клетками	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС
10	Контрольные CAR T-клетки*	76,23±11,63
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	84,37±5,07
13	Контрольные CAR T-клетки*	133,48±9,59
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	125,27±9,15
17	Контрольные CAR T-клетки*	183,313±22,76
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	121,785±10,23
20	Контрольные CAR T-клетки*	464,89±36,93407897
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	329,56±47,42192007
24	Контрольные CAR T-клетки*	977,69±51,55
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	171,98±40,05
26	Контрольные CAR T-клетки*	1341,53±116,36
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	53,83±25,81
28	Контрольные CAR T-клетки*	1628,25±97,27
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	0±0
32	Контрольные CAR T-клетки*	2314,27±147,13
	Анти-HLA-A2/MAGE-	0±0

	A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	
34	Контрольные CAR T-клетки*	2759,90±190,94
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	0±0
42	Контрольные CAR T-клетки*	Умерщвленные животные
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	0±0
47	Контрольные CAR T-клетки*	Умерщвленные животные
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	0±0
55	Контрольные CAR T-клетки*	Умерщвленные животные
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	0±0

* Контрольные CAR T-клетки экспрессировали анти-HLA-A2/HPV16E7 (11-19) scFv CAR

Таблица 9. Направленные на HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ CAR T-клетки способствуют выживаемости

CAR T-клетка Лечение	Количество мышей без опухолей (34 день)
Контрольные CAR T-клетки	0 из 5 (все подвергнуты эвтаназии)
Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T-клетки	5 из 5

[0203] В то время как опухоли A375 прогрессировали росли у мышей, получавших нерелевантные scFv CAR T-клетки, CAR T-клетки, кодирующие анти-HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ scFv CAR 31345, подавляли рост и впоследствии уничтожали сформировавшиеся опухоли A375 *in vivo*, как показано в Таблицах 8 и 9 и на Фиг. 3А и Фиг. 3В.

Пример 7. Нацеленные на MAGE-A4 T-клетки CAR снижают рост опухолей, экспрессирующих MAGE-A4, *in vivo* в ксеногенной модели множественной миеломы

[0204] Для определения *in vivo* эффективности T-клеток с нацеленным на HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ химерным антигенным рецептором (CAR) было проведено исследование ксеногенной опухоли на мышях с использованием опухолевых клеток человеческой множественной миеломы IM9, которые экспрессируют MAGE-A4. На 0 день

иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) подкожно инъецировали 5×10^6 опухолевых клеток человеческой множественной миеломы HLA-A2⁺MAGE-A4⁺ IM9. На 7-й день эксперимента, после того как опухоли имели достаточно времени для становления, мышам внутривенно вводили 4×10^6 Т-клеток, которые экспрессируют либо контрольный CAR (анти-HLA-A2/HPV16E7 (11-19) scFv, в ориентации VL-VH) или анти-HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ CAR (как определено по частоте клеток, экспрессирующих GFP, который является маркером для тех клеток, которые были трансдуцированы CAR). В частности, у мышей (n=5 на группу) вводили либо 4×10^6 нерелевантных scFc CAR Т-клеток (контроль ScFv CAR) или 4×10^6 анти-MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ CAR Т, кодирующих 31345 ScFv CAR. Рост опухоли оценивали в течение 52 дней путем измерения объемов опухоли.

[0205] Для определения объема опухолей с помощью наружного штангенциркуля определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объемы опухолей исходя из измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле: Объем (мм³)=(длина x ширина²)/2.

Таблица 10. Направленные на HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ CAR Т-клетки снижают рост опухоли

День	Лечение CAR Т-клетками	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС
7	Контрольные CAR Т-клетки*	69,40±15,45
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR Т	60,92±3,61
10	Контрольные CAR Т-клетки*	168,68±42,57
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR Т	176,45±12,41
14	Контрольные CAR Т-клетки*	447,01±75,34
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR Т	409,01±83,91
17	Контрольные CAR Т-клетки*	1036,89±194,01
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR Т	574,02±142,44
21	Контрольные CAR Т-клетки*	1838,18±316,87

	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	884,57±464,47
23	Контрольные CAR T-клетки*	2043,35±190,25
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	1013,67±585,48
25	Контрольные CAR T-клетки*	3021,93±153,39
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	1474,85±914,45
29	Контрольные CAR T-клетки*	Умерщвленные животные
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	2282,63±1418,51
31	Контрольные CAR T-клетки*	Умерщвленные животные
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	2920,38±1832,96
39	Контрольные CAR T-клетки*	Умерщвленные животные
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	0,00±0,00
44	Контрольные CAR T-клетки*	Умерщвленные животные
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	0,00±0,00
52	Контрольные CAR T-клетки*	Умерщвленные животные
	Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T	0,00±0,00

* Контрольные CAR T-клетки экспрессировали анти-HLA-A2/HPV16E7 (11-19) scFv CAR

Таблица 11. Направленные на HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ CAR T-клетки способствуют выживаемости

CAR T-клетка Лечение	Количество мышей без опухолей (34 день)
Контрольные CAR T-клетки	0 из 5 (все подвергнуты эвтаназии)
Анти-HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR T-клетки	3 из 5

[0206] В то время как опухоли IM9 прогрессировали у мышей, получавших нерелевантные scFv CAR T-клетки, CAR T-клетки, кодирующие 31345 анти-HLA-A2/MAGE-A4₂₈₆₋₂₉₄ scFv CAR, подавляли рост и впоследствии уничтожали образовавшиеся опухоли IM9 в 3 из 5 мышей *in vivo*, как показано в таблицах 10 и 11, и на Фиг. 4А и Фиг. 4В.

Пример 8. Нацеленные на MAGE-A4 Т-клетки CAR снижают рост опухолей, экспрессирующих MAGE-A4, *in vivo* в ксеногенной модели меланомы A375

[0207] Химерные антигенные рецепторы, содержащие либо анти-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ scFv в ориентации V_L-V_H плюс либо 1) шарнирный/трансмембранный домен huCD8, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3z (BB/z CAR) или 2) шарнирные/трансмембранные/костимулирующие домены huCD28 и сигнальный домен CD3z (28/z CAR), были сконструированы с использованием последовательностей V_L и V_H анти-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ антитела, mAb31345. В качестве несвязывающего контроля был разработан BB/z CAR с использованием scFv с шарнирным/трансмембранным доменом huCD8, костимулирующим доменом 4-1BB и сигнальным доменом CD3z. Эти CAR были клонированы в лентивирусный вектор pLVX с промотором EF1a и последовательностью IRES:eGFP (для отслеживания клеток, трансдуцированных CAR), и был получен лентивирус с псевдотипом VSV.

[0208] CD3⁺ Т-клетки выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) от двух нормальных доноров («Донор 1» и «Донор 2»), стимулировали микрочастицами с CD3/CD28 и 100 Ед/мл рекомбинантного человеческого IL-2 и трансдуцировали с помощью лентивируса с MOI=5. Трансдуцированные клетки размножали в течение 19 дней с помощью микрочастиц с CD3/CD28 и 100 Ед/мл рекомбинантного человеческого IL-2 перед криоконсервацией до применения в эксперименте *in vivo*.

[0209] Для определения *in vivo* эффективности Т-клеток с нацеленным на HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ химерным антигенным рецептором (CAR) было проведено исследование с использованием ксеногенной опухоли. На 0 день иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) подкожно инъецировали 5×10⁶ опухолевых клеток человеческой меланомы HLA-A2⁺MAGEA4⁺ A375. Методики масс-спектрометрии использовали для определения того, что клетки меланомы A375 экспрессируют приблизительно 424 копии пептида MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ на клеточной поверхности. На 13 день после появления опухоли мышам (n=5 на группу) внутривенно вводили 4×10⁶ Т-клеток, которые экспрессируют либо несвязывающийся контрольный BB/z CAR (контрольная

CAR T), либо анти-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR или анти-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR (как определено по частоте клеток, экспрессирующих GFP, который является маркером для тех клеток, которые были трансдуцированы CAR) от двух разных доноров. Рост опухоли оценивали в течение 64 дней путем измерения объемов опухоли.

[0210] Для определения объема опухолей с помощью наружного штангенциркуля определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объемы опухолей исходя из измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле: Объем (мм³)=(длина x ширина²)/2.

[0211] Донор 1: опухоли A375 прогрессировали у мышей, получавших либо контрольные CAR T-клетки, либо MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T-клетки. Напротив, MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z подавлял рост сформировавшихся опухолей A375 in vivo, при этом у 1 из 5 мышей опухоль отсутствовала на 64 день. Повышенная эффективность MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR по сравнению с MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR была подтверждена, поскольку размеры опухолей на 27, 29, 33, 36, 40 и 44 дни были статистически значимыми, с p<0,0001 согласно двухфакторному дисперсионному анализу.

[0212] Донор 2: опухоли A375 прогрессировали у мышей, получавших контрольные CAR T-клетки. Лечение T-клетками с MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z и MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR подавляло рост опухоли A375, но с другой кинетикой. T-клетки с MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR действуют с более быстрой кинетикой, уничтожая опухоли у 5 из 5 мышей к 27 дню. T-клетки с MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR действуют с более медленной кинетикой, уничтожая опухоли у 4 из 5 мышей к 44 дню. Повышенная кинетика противоопухолевой активности MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR по сравнению с MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR была подтверждена, поскольку размеры опухолей на 19 и 22 дни являются статистически значимыми, с p=0,0071 и p=0,0008, соответственно, согласно двухфакторному дисперсионному анализу. В Таблицах 12-27 приведены сводные данные.

Таблица 12: Сводные данные, 7 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 7 день	Количество выживших мышей (из 5) на 7 день
Донор 1: Контрольная CAR T	76,5 ± 9,6	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	73,8 ± 4,0	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	89,9 ± 4,4	5
Донор 2: Контрольная CAR T	102,8 ± 0,6	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	87,1 ± 9,7	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	83,7 ± 4,0	5

Таблица 13: Сводные данные, 12 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС	Количество выживших мышей
------------------	--	------------------------------

	на 12 день	(из 5) на 12 день
Донор 1: Контрольная CAR T	152,1 ± 27,7	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	131,2 ± 22,1	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	153,0 ± 7,0	5
Донор 2: Контрольная CAR T	177,1 ± 26,4	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	154,9 ± 7,3	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	117,2 ± 9,3	5

Таблица 14: Сводные данные, 15 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 15 день	Количество выживших мышей (из 5) на 15 день
Донор 1: Контрольная CAR T	311,7 ± 61,7	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	308,8 ± 33,2	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	337,9 ± 16,5	5
Донор 2: Контрольная CAR T	443,5 ± 56,9	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	343,2 ± 41,2	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	247,2 ± 42,3	5

Таблица 15: Сводные данные, 16 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 16 день	Количество выживших мышей (из 5) на 16-й день
Донор 1: Контрольная CAR T	336,2 ± 60,9	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	402,6 ± 35,7	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	440,6 ± 36,4	5
Донор 2: Контрольная CAR T	541,7 ± 62,6	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	409,9 ± 40,7	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	212,8 ± 33,8	5

Таблица 16: Сводные данные, 19 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 19 день	Количество выживших мышей (из 5) на 19-й день
Донор 1: Контрольная CAR T	731,6 ± 103,9	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	755,6 ± 92,2	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	769,7 ± 86,6	5

Донор 2: Контрольная CAR T	1136,3 ± 122,1	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	603,9 ± 36,8	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	98,4 ± 15,6	5

Таблица 17: Сводные данные, 22 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 22 день	Количество выживших мышей (из 5) на 22 день
Донор 1: Контрольная CAR T	1021,3 ± 138,5	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	1027,8 ± 111,5	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	785,7 ± 97,4	5
Донор 2: Контрольная CAR T	1725,9 ± 216,2	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	641,5 ± 119,9	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	30,2 ± 13,0	5

Таблица 18: Сводные данные, 27 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 27 день	Количество выживших мышей (из 5) на 27 день
Донор 1: Контрольная CAR T	1983,6 ± 187,3	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	1759,7 ± 247,6	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	347,9 ± 54,2	5
Донор 2: Контрольная CAR T	2806,0 ± 222,7	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	258,2 ± 50,5	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 19: Сводные данные, 29 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 29 день	Количество выживших мышей (из 5) на 29 день
Донор 1: Контрольная CAR T	2503,7 ± 169,4	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	1941,9 ± 252,1	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	270,3 ± 49,9	5
Донор 2: Контрольная CAR T	3387,0 ± 154,8	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	203,6 ± 123,4	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 20: Сводные данные, 33 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 33 день	Количество выживших мышей (из 5) на 33 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	2201,9 ± 321,9	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	202,7 ± 70,7	5
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	106,2 ± 80,5	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 21: Сводные данные, 36 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 40 день	Количество выживших мышей (из 5) на 36 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	2171,2 ± 286,1	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	230,9 ± 106,4	5
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	97,1 ± 83,8	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 22: Сводные данные, 40 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 40 день	Количество выживших мышей (из 5) на 40 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	2431,9 ± 359,6	
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	443,9 ± 175,3	
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	205,7 ± 193,7	

Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5
---	-----------	---

Таблица 23: Сводные данные, 44 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 44 день	Количество выживших мышей (из 5) на 44 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	2892,7 ± 432,7	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	416,7 ± 195,0	5
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	166,0 ± 166,0	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 24: Сводные данные, 48 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 48 день	Количество выживших мышей (из 5) на 48 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	3266,4 ± 1026,4	2
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	749,7 ± 364,4	5
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	292,0 ± 292,0	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 25: Сводные данные, 50 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 50 день	Количество выживших мышей (из 5) на 50 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	2835,7 ± 0,0	1
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	955,8 ± 367,2	5
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0

Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	349,0 ± 349,0	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 26: Сводные данные, 57 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 57 день	Количество выживших мышей (из 5) на 57 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	1311,0 ± 660,5	3
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	0,0 ± 0,0	4
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 27: Сводные данные, 64 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 64 день	Количество выживших мышей (из 5) на 64 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	1973,0 ± 990,8	3
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	0,0 ± 0,0	4
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

[0213] Эти результаты демонстрируют, что MAGE-A4-специфические CAR по настоящему изобретению обладают сильным противоопухолевым действием *in vivo*.

Пример 9. Нацеленные на MAGE-A4 Т-клетки CAR снижают рост опухолей, экспрессирующих MAGE-A4, *in vivo* в ксеногенной модели меланомы SK-MEL-37

[0214] Химерные антигенные рецепторы, содержащие либо анти-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ scFv в ориентации V_L-V_H плюс либо 1) шарнирный/трансмембранный домен huCD8, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3z (BB/z CAR) или 2) шарнирные/трансмембранные/костимулирующие домены huCD28 и сигнальный домен

CD3z (28/z CAR) были сконструированы с использованием последовательностей V_L и V_H анти-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ антитела, mAb31345. В качестве несвязывающего контроля был разработан BB/z CAR с использованием другого scFv плюс шарнирный/трансмембранный домен huCD8, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3z. Эти CAR были клонированы в лентивирусный вектор pLVX с промотором EF1a и последовательностью IRES:eGFP (для отслеживания клеток, трансдуцированных CAR), и был получен лентивирус с псевдотипом VSV.

[0215] CD3⁺ Т-клетки выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) от двух нормальных доноров («Донор 1» и «Донор 2»), стимулировали микрочастицами с CD3/CD28 и 100 Ед/мл рекомбинантного человеческого IL-2 и трансдуцировали с помощью лентивируса с MOI=5. Трансдуцированные клетки размножали в течение 19 дней с помощью микрочастиц с CD3/CD28 и 100 Ед/мл рекомбинантного человеческого IL-2 перед криоконсервацией до применения в эксперименте *in vivo*.

[0216] Для определения *in vivo* эффективности Т-клеток с нацеленным на HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ химерным антигенным рецептором (CAR) было проведено исследование ксеногенной опухоли. На 0 день иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) подкожно инъецировали 5×10⁶ опухолевых клеток человеческой меланомы HLA-A2⁺MAGEA4⁺ SK-MEL-37. Методы масс-спектрометрии были использованы для определения того, что клетки меланомы SK-MEL-37 экспрессируют приблизительно 1326 копий пептида MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ на клеточной поверхности. На 7 день после появления опухоли мышам (n=5 на группу) внутривенно вводили 4×10⁶ Т-клеток, которые экспрессируют либо несвязывающийся контрольный BB/z CAR (контрольная CAR Т), либо анти-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR или анти-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR (как определено по частоте клеток, экспрессирующих GFP, который является маркером для тех клеток, которые были трансдуцированы CAR) от двух разных доноров. Рост опухоли оценивали в течение 64 дней путем измерения объемов опухоли.

[0217] Для определения объема опухолей с помощью наружного штангенциркуля определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объемы опухолей исходя из измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле: Объем (мм³)=(длина x ширина²)/2.

Таблица 28. Сводные данные CAR

Исходные мкАт №	Специфичность	Описание
Н/Д	Несвязывающийся контроль	Анти-HLA-A2/HPV16E7 ₁₁₋₁₉ scFv 17363 в ориентации VL-VH с шарнирным/трансмембранным доменом huCD8, костимулирующим доменом 4-1BB и сигнальным доменом CD3z (контрольный CAR)

31345	HLA-A2/MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄	Анти-MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ scFv 31345 в ориентации VL-VH с шарнирным/трансмембранным доменом huCD8, костимулирующим доменом 4-1BB и сигнальным доменом CD3z (BB/z CAR)
31345	HLA-A2/MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄	Анти-MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ scFv 31345 в ориентации VL-VH с шарнирным/трансмембранным/костимулирующим доменами huCD28 и сигнальным доменом CD3z (28/z CAR)

[0218] Донор 1: опухоли SK-MEL-37 прогрессировали у мышей, получавших либо контрольные CAR Т-клетки, либо MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR Т-клетки. Напротив, MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z подавлял рост сформировавшихся опухолей SK-MEL-37 *in vivo*. Эффективность MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR по сравнению с MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR наблюдали для размеров опухоли на 31, 35, 40, 47, 55 и 62 дни, которые являются статистически значимыми, с $p < 0,0001$ согласно двухфакторному дисперсионному анализу.

Донор 2: опухоли SK-MEL-37 прогрессировали у мышей, получавших контрольные CAR Т-клетки. Лечение MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR Т-клетками продемонстрировала эффективность и задержала рост опухоли примерно на одну неделю, а MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR Т-клетки сильно подавили рост опухоли SK-MEL-37, в результате чего опухоли стали неопределяемыми (непальпируемыми) у 5 из 5 мышей к 20 дню. Эти опухоли оставались необнаруживаемыми в течение 62-69 дней, после чего опухоли рецидивировали.

[0219] В совокупности результаты демонстрируют, что специфические для MAGEA4 CAR по настоящему изобретению демонстрируют *in vivo* противоопухолевую активность и противоопухолевую кинетику (Таблицы 29-45).

Таблица 29: Сводные данные, 6 день

Лечение CAR Т	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 6 день	Количество выживших мышей (из 5) на 6 день
Донор 1: Контрольная CAR Т	80,6 ± 4,2	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR Т	109,4 ± 14,6	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR Т	115,3 ± 7,0	5
Донор 2: Контрольная CAR Т	92,6 ± 12,4	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR Т	115,4 ± 16,7	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR Т	112,8 ± 5,5	5

Таблица 30: Сводные данные, 11 день

Лечение	Средний размер	Количество
---------	----------------	------------

CAR T	опухоли (мм ³)±СОС на 11 день	выживших мышей (из 5) на 11 день
Донор 1: Контрольная CAR T	104,0 ± 9,4	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	133,5 ± 21,1	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	120,8 ± 22,0	5
Донор 2: Контрольная CAR T	87,7 ± 10,6	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	97,3 ± 12,9	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	136,9 ± 23,3	5

Таблица 31: Сводные данные, 13 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 13 день	Количество выживших мышей (из 5) на 13 день
Донор 1: Контрольная CAR T	142,2 ± 9,0	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	133,7 ± 20,1	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	106,4 ± 17,0	5
Донор 2: Контрольная CAR T	106,4 ± 14,7	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	83,5 ± 16,4	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	72,7 ± 14,8	5

Таблица 32: Сводные данные, 18 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 18 день	Количество выживших мышей (из 5) на 18 день
Донор 1: Контрольная CAR T	181,3 ± 24,4	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	171,3 ± 29,3	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	63,7 ± 6,8	5
Донор 2: Контрольная CAR T	139,8 ± 17,6	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	70,7 ± 6,6	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	14,1 ± 6,5	5

Таблица 33: Сводные данные, 20 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 20 день	Количество выживших мышей (из 5) на 20 день
Донор 1: Контрольная CAR T	202,7 ± 16,5	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	194,5 ± 33,0	5

Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	70,0 ± 15,6	5
Донор 2: Контрольная CAR T	174,3 ± 33,7	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	79,4 ± 11,0	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 34: Сводные данные, 24 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 24 день	Количество выживших мышей (из 5) на 24 день
Донор 1: Контрольная CAR T	312,5 ± 35,3	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	272,3 ± 66,8	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	52,9 ± 12,2	5
Донор 2: Контрольная CAR T	237,3 ± 37,7	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	78,2 ± 11,2	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 35: Сводные данные, 27 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 27 день	Количество выживших мышей (из 5) на 27 день
Донор 1: Контрольная CAR T	396,5 ± 44,7	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	328,0 ± 60,3	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	49,9 ± 16,1	5
Донор 2: Контрольная CAR T	371,0 ± 54,6	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	100,0 ± 15,9	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 36: Сводные данные, 31 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 31 день	Количество выживших мышей (из 5) на 31 день
Донор 1: Контрольная CAR T	635,0 ± 73,7	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	610,4 ± 116,4	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	50,5 ± 11,8	5
Донор 2: Контрольная CAR T	512,6 ± 54,2	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	158,0 ± 17,2	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 37: Сводные данные, 35 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 35 день	Количество выживших мышей (из 5) на 35 день
Донор 1: Контрольная CAR T	796,8 ± 132,7	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	803,1 ± 166,7	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	52,6 ± 19,8	5
Донор 2: Контрольная CAR T	724,1 ± 85,7	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	325,4 ± 61,1	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 38: Сводные данные, 40 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 40 день	Количество выживших мышей (из 5) на 40 день
Донор 1: Контрольная CAR T	986,3 ± 136,1	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	1067,8 ± 152,5	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	62,2 ± 28,2	5
Донор 2: Контрольная CAR T	778,5 ± 69,8	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	446,5 ± 71,1	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 39: Сводные данные, 47 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 47 день	Количество выживших мышей (из 5) на 47 день
Донор 1: Контрольная CAR T	1414,9 ± 311,2	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	1205,2 ± 193,7	5
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	80,5 ± 42,3	5
Донор 2: Контрольная CAR T	804,6 ± 85,8	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	496,7 ± 57,6	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 40: Сводные данные, 55 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 55 день	Количество выживших мышей (из 5) на 55 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные	0

	животные	
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	175,9 ± 76,5	5
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	823,1 ± 85,8	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 41: Сводные данные, 62 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 62 день	Количество выживших мышей (из 5) на 62 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	298,0 ± 110,8	5
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	1048,0 ± 124,3	5
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	0,0 ± 0,0	5

Таблица 42: Сводные данные, 69 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 69 день	Количество выживших мышей (из 5) на 69 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	533,3 ± 166,8	5
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	Умерщвленные животные	0

Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	7,3 ± 5,6	5
---	-----------	---

Таблица 43: Сводные данные, 77 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 77 день	Количество выживших мышей (из 5) на 77 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	759,6 ± 175,7	5
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	20,6 ± 10,1	5

Таблица 44: Сводные данные, 84 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 84 день	Количество выживших мышей (из 5) на 84 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	73,0 ± 42,6	5

Таблица 45: Сводные данные, 118 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³)±СОС на 118 день	Количество выживших мышей (из 5) на 118 день
Донор 1: Контрольная CAR T	Умерщвленные	0

	животные	
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 1: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: Контрольная CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ BB/z CAR T	Умерщвленные животные	0
Донор 2: MAGEA4 ₂₈₆₋₂₉₄ 28/z CAR T	928,2 ± 291,1	5

Пример 10. Т-клетки с нацеленным на MAGE-A4 (230-239) CAR снижают рост экспрессирующей MAGE-A4 опухоли *in vivo* в ксеногенной модели меланомы A375

[0220] Химерные антигенные рецепторы, содержащие либо анти-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ scFv в ориентации V_L-V_H, плюс либо 1) шарнирный/трансмембранный домен huCD8, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3z (BB/z CAR) или 2) шарнирные/трансмембранные/костимулирующие домены huCD28 и сигнальный домен CD3z (28/z CAR) были сконструированы с использованием последовательностей V_L и V_H mAb33229. В качестве несвязывающего контроля был сконструирован 28/z CAR с использованием нерелевантного scFv плюс шарнирные/трансмембранные/костимулирующие домены huCD28 и сигнальный домен CD3z. Эти CAR были клонированы в лентивирусный вектор pLVX с промотором EF1a и последовательностью P2A:eGFP (для отслеживания клеток, трансдуцированных CAR), и был получен лентивирус с псевдотипом VSV.

[0221] CD3⁺ Т-клетки выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) от нормального донора, стимулировали микрочастицами с CD3/CD28 плюс 100 Ед/мл рекомбинантного человеческого IL-2 и трансдуцировали лентивирусом при MOI=5. Трансдуцированные клетки размножали в течение приблизительно 14 дней с помощью микрочастиц с CD3/CD28 и 100 Ед/мл рекомбинантного человеческого IL-2 перед криоконсервацией до применения в эксперименте *in vivo*.

[0222] Для определения *in vivo* эффективности Т-клеток с нацеленным на HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ химерным антигенным рецептором (CAR) было проведено исследование ксеногенной опухоли. На 0 день иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) подкожно инъецировали 5×10⁶ опухолевых клеток человеческой меланомы HLA-A2⁺MAGEA4⁺ A375. Для определения того, что клетки меланомы A375 экспрессируют приблизительно 553 копии пептида HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ на клеточной поверхности, использовали методы масс-спектрометрии. На 13 день после того, как развились опухоли, мышам (n=4 или 5 на группу) внутривенно вводили 4×10⁶ Т-клеток, которые экспрессируют либо несвязывающий контроль BB/z CAR

(контрольная CAR T), либо анти-HLA- A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR или анти-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR (что определяется частотой клеток, экспрессирующих либо GFP, который является маркером для тех клеток, которые были трансдуцированы CAR). Рост опухоли оценивали в течение 28 дней путем измерения объемов опухоли.

[0223] Для определения объема опухолей с помощью наружного штангенциркуля определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объемы опухолей исходя из измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле: Объем (мм³)=(длина x ширина²)/2.

[0224] Опухоли A375 прогрессировали у не получавших лечение мышей и мышей, получавших контрольные CAR T-клетки. Мыши, получавшие анти-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T-клетки, продемонстрировали опухолевый контроль со сниженным ростом опухоли по сравнению с мышами, получавшими контрольный CAR T, на 19-й день (p<0,02), 23 (p<0,02) и 26 (p<0,0001) (статистика проанализирована с помощью двухфакторного дисперсионного анализа). Лечение анти-HLA-A2/MAGEA4₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T также привело к подавлению роста развившейся опухоли A375 на 19-й день (p=0,007), 23 (p<0,0001) и 26 (p<0,0001) (статистические данные анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа). См. Таблицы 46-54.

Таблица 46: Сводные данные, 7 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³) на 7 день	Стандартная ошибка среднего размера опухоли (СОС)	Количество выживших мышей (из 5) на 7 день
Без лечения	59,7	9,7	4
Контрольная CAR T	98,1	16,2	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	72,8	3,9	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	72,3	5,9	5

Таблица 47: Сводные данные, 10 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³) на 10 день	Стандартная ошибка среднего размера опухоли (СОС)	Количество выживших мышей (из 5) на 10 день
Без лечения	154,0	16,1	4
Контрольная CAR T	163,0	21,6	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	146,1	4,9	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	148,9	14,1	5

Таблица 48: Сводные данные, 13 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³) на 13 день	Стандартная ошибка среднего размера опухоли (СОС)	Количество выживших мышей (из 5) на 13 день
Без лечения	302,9	47,2	4
Контрольная CAR T	369,4	47,3	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	209,9	30,3	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	304,4	25,7	5

Таблица 49: Сводные данные, 17 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³) на 17 день	Стандартная ошибка среднего размера опухоли (СОС)	Количество выживших мышей (из 5) на 17 день
Без лечения	702,5	105,7	4
Контрольная CAR T	652,7	71,3	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	416,1	51,4	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	487,1	32,0	5

Таблица 50: Сводные данные, 19 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³) на 19 день	Стандартная ошибка среднего размера опухоли (СОС)	Количество выживших мышей (из 5) на 19-й день
Без лечения	1191,9	174,2	4
Контрольная CAR T	1055,6	68,2	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	590,9	111,2	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	535,4	60,6	5

Таблица 51: Сводные данные, 23 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³) на 23	Стандартная ошибка среднего размера	Количество выживших мышей (из 5) на 23 день
------------------	--	--	--

	день	опухоли (СОС)	
Без лечения	1823,6	240,4	4
Контрольная CAR T	1583,3	74,6	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	1103,7	234,8	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	356,2	67,3	5

Таблица 52: Сводные данные, 26 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³) на 26 день	Стандартная ошибка среднего размера опухоли (СОС)	Количество выживших мышей (из 5) на 26 день
Без лечения	2605,5	196,9	4
Контрольная CAR T	2246,8	132,9	5
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	1435,5	498,0	4
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	332,1	132,4	5

Таблица 53: Сводные данные, 33 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³) на 33 день	Стандартная ошибка среднего размера опухоли (СОС)	Количество выживших мышей (из 5) на 33 день
Без лечения	Подвергали эвтаназии	Подвергали эвтаназии	0
Контрольная CAR T	Подвергали эвтаназии	Подвергали эвтаназии	0
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	2618,3	652,4	4
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	712,1	302,9	5

Таблица 54: Сводные данные, 37 день

Лечение CAR T	Средний размер опухоли (мм ³) на 37 день	Стандартная ошибка среднего размера опухоли (СОС)	Количество выживших мышей (из 5) на 37 день
Без лечения	Подвергали эвтаназии	Подвергали эвтаназии	0

Контрольная CAR T	Подвергали эвтаназии	Подвергали эвтаназии	0
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ BB/z CAR T	Подвергали эвтаназии	Подвергали эвтаназии	0
MAGEA4 ₂₃₀₋₂₃₉ 28/z CAR T	1021,8	387,1	5

Пример 11: Структурный анализ связывания Fab/растворимого TCR с HLA-A2, связанным с полипептидом MAGE-A4 (230-239)

[0225] Чтобы лучше понять специфические взаимодействия между антителом или TCR и комплексом HLA-пептид, были определены две структуры рентгеновских кристаллов и три структуры криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) для фрагментов Fab антител или сконструированных растворимых частей TCR (sTCR), связанных с комплексом HLA-A2 с бета-2-микроглобулином (HLA-A2/b2m), презентующий полипептид MAGE-A4 230-239 в бороздке для связывания пептида HLA (таблица 55). Рентгеновские структуры комплексов, содержащих два Fab, определены с разрешением 1,4 и 2,5 Å. Эти два Fab имеют очень похожие последовательности и демонстрируют почти идентичные режимы связывания. Структуру крио-ЭМ комплекса, содержащего Fab 33229, определяли при разрешении 3,7 Å, а структуры крио-ЭМ дополнительных Fab и sTCR определяли при разрешении 3,0 Å и 2,9 Å, соответственно. Хотя они охватывают диапазон разрешений, в каждой из структур презентуемые HLA пептидные остатки MAGEA4: 230-239 четко видны на картах плотности электронов/крио-ЭМ, что позволяет точно определять взаимодействия на уровне остатков между презентуемым HLA пептидом и определяющими комплементарность областями (CDR) Fab или sTCR.

[0226] Структуры демонстрируют, что Fab связывают комплекс HLA-пептид с общей сходной ориентацией. CDR тяжелой цепи располагались проксимальнее N-конца пептида, а CDR легкой цепи располагались проксимальнее C-конца пептида. В каждой из Fab-связанных структур контактирующий с растворителем остаток полипептида MAGE-A4 аргинин 235 был расположен около центральной плоскости, которая разделяла CDR тяжелой и легкой цепей. Четыре Fab распознали и связали три различных ротамера аргинина 235. Остальная часть конформации презентуемого HLA пептида была очень похожей по структурам.

[0227] sTCR связывает комплекс HLA-пептид в ориентации, типичной для TCR, с α -цепью ближе к N-концевой стороне пептида, а β -цепью ближе к C-концевой стороне. CDR sTCR были сдвинуты ближе к N-концу пептида по сравнению с Fab. sTCR связывался с ротамером пептидного остатка аргинина 235, который отличался от тех, которые наблюдались в четырех структурах, содержащих Fab.

[0228] Контакты между Fab или sTCR и пептидом приведены в Таблице 55. «Контакты» в данном документе определяются как остатки Fab/sTCR с неводородными атомами, которые находятся в пределах 3,5 Å от неводородных атомов презентуемого HLA пептида, и могут включать водородные связи, заряд-зарядовые взаимодействия или

гидрофобные/ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Связанный пептид нумеруется в соответствии с положениями остатков в полипептиде MAGE-A4 следующим образом:

Аминокислота	G	V	Y	D	G	R	E	H	T	V	(SEQ ID NO: 49)
Положение	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	

[0229] Пептидные контакты, создаваемые каждым из Fab, сосредоточены почти исключительно в CDR HCDR3, LCDR1 и LCDR3. HCDR3 каждого антитела имела множественные контакты с боковой цепью остатка 233 MAGE-A4. HCDR3 и/или LCDR3 каждого Fab приводили в контакт с боковой цепью остатка 235. Карбонил остова пептидного остатка 236 приводили в контакт с LCDR1 каждого Fab. Ни один из четырех Fab не приводят в контакт с пептидными остатками 230, 231, 232, 234 или 239, большинство из которых недоступны для связывания Fab, поскольку они скрыты в бороздке HLA. Хотя пептидный остаток 234 контактирует с растворителем, его отсутствие боковой цепи, поскольку глицин ограничивает способность к контактам с CDR. Тем не менее, замены в этом глицине 234 могут снизить связывающую активность для этих антител из-за возникающего в результате стерического конфликта между более объемным пептидным остатком и петлями HCDR3, которые находятся в непосредственной близости.

[0230] sTCR связывался с остатком 233 через свои петли $\alpha 1$ и $\alpha 3$, а также с пептидным остатком 235 через свои петли $\beta 1$ и $\beta 3$. Остатки пептидов 230, 231, 232, 234, 236, 237, 238, 239 не приводили в контакт с sTCR; поэтому охват пептидным контактом sTCR был менее полным, чем у каждого из упомянутых выше Fab, или чем наблюдаемый в других структурах TCR, связанных с декамерными пептидами (например, PDB 3QDG).

Таблица 55: Контакты пептидов

Молекула	Контакты с пептидом MAGEA4:230-239 (показаны CDR и остатки)									
	G 230	V 231	Y 232	D 233	G 234	R 235	E 236	H 237	T 238	V 239
Fab1	Н/Д	Н/Д	Н/Д	H3: A108, I109	Н/ Д	H3: D112 L3: S91, Y92	L1: S30, Y32	L3: Y92	E6 8	Н/Д
Fab2	Н/Д	Н/Д	Н/Д	H3: A108, I109	Н/ Д	H3: D112 L3: S91, Y92	L1: T30, Y32	L3: Y92	Н/ Д	Н/Д
Fab3	Н/Д	Н/Д	Н/Д	H3: P101, T102	Н/ Д	L3: S91, Y92	H3: Y108	Н/Д	Н/ Д	Н/Д

							L1: Y32			
Fab4 (from мкАт 33229)	Н/Д	Н/Д	Н/Д	H3: R101, R102, T103	Н/ Д	H3: Y106	L1: Y32	Н/Д	Н/ Д	Н/Д
sTCR	Н/Д	Н/Д	Н/Д	α 1: S31 α 3: G97, Y99	Н/ Д	β 1: E30 β 3: F95	Н/Д	Н/Д	Н/ Д	Н/Д

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Таблица 56: Идентификаторы последовательности

SEQ ID NO:	ДНК/полипептид	Последовательность
1	ДНК	HCVR mAb31345 и mAb31345*
2	Полипептид	HCVR mAb31345 и mAb31345*
3	ДНК	HCDR1 mAb31345 и mAb31345*
4	Полипептид	HCDR1 mAb31345 и mAb31345*
5	ДНК	HCDR2 mAb31345 и mAb31345*
6	Полипептид	HCDR2 mAb31345 и mAb31345*
7	ДНК	HCDR3 mAb31345 и mAb31345*
8	Полипептид	HCDR3 mAb31345 и mAb31345*
9	ДНК	LCVR mAb31345*
10	Полипептид	LCVR mAb31345*
11	ДНК	LCDR1 mAb31345 и mAb31345*
12	Полипептид	LCDR1 mAb31345 и mAb31345*
13	ДНК	LCDR2 mAb31345 и

		mAb31345*
14	Полипептид	LCDR2 mAb31345 и mAb31345*
15	ДНК	LCDR3 mAb31345 и mAb31345*
16	Полипептид	LCDR3 mAb31345 и mAb31345*
17	ДНК	HC mAb31345 и mAb31345*
18	Полипептид	HC mAb31345 и mAb31345*
19	ДНК	LC mAb31345 и mAb31345*
20	Полипептид	LC mAb31345 и mAb31345*
21	ДНК	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен 4-1BB) с полноразмерным 31345*
22	Полипептид	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен 4-1BB) с полноразмерным 31345*
23	Полипептид	Линкер (G4S) ₁
24	Полипептид	Линкер (G4S) ₂
25	Полипептид	Линкер (G4S) ₃
26	Полипептид	Линкер GSTSGSGKPGSGEGSTKG
27	Полипептид	Шарнир CD8 α
28	Полипептид	Трансмембранный домен CD8
29	Полипептид	Костимулирующий домен 4-1BB
30	Полипептид	Сигнальный домен CD3-дзета
31	ДНК	Полноразмерный MAGE-A4

32	Полипептид	Полноразмерный MAGE-A4
33	Полипептид	MAGE-A4 (286-294)
34	ДНК	Контрольный CAR с анти- HLA-A2/HPV16E7(11-19) scFv
35	Полипептид	Контрольный CAR с анти- HLA-A2/HPV16E7(11-19) scFv
36	ДНК	LCVR mAb31345
37	Полипептид	LCVR mAb31345
38	ДНК	Нацеленный на HLA- A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен 4-1BB) с полноразмерным 31345
39	Полипептид	Нацеленный на HLA- A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен 4-1BB) с полноразмерным 31345
40	Полипептид	Пептид 2A и зеленый флуоресцентный белок
41	Полипептид	Шарнир CD28
42	ДНК	Шарнир CD28
43	Полипептид	Трансмембранный домен CD28
44	ДНК	Трансмембранный домен CD28
45	Полипептид	Костимулирующий домен CD28
46	ДНК	Костимулирующий домен CD28
47	Полипептид	Нацеленный на HLA- A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR

		(костимулирующий домен CD28) с полноразмерным 31345
48	ДНК	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен CD28) с полноразмерным 31345
49	Полипептид	MAGE-A4 (230-239)
50	ДНК	HCVR mAb33229
51	Полипептид	HCVR mAb33229
52	ДНК	HCDR1 mAb33229
53	Полипептид	HCDR1 mAb33229
54	ДНК	HCDR2 mAb33229
55	Полипептид	HCDR2 mAb33229
56	ДНК	HCDR3 mAb33229
57	Полипептид	HCDR3 mAb33229
58	ДНК	LCVR mAb33229
59	Полипептид	LCVR mAb33229
60	ДНК	LCDR1 mAb33229
61	Полипептид	LCDR1 mAb33229
62	ДНК	LCDR2 mAb33229
63	Полипептид	LCDR2 mAb33229
64	ДНК	LCDR3 mAb33229
65	Полипептид	LCDR3 mAb33229
66	ДНК	HC mAb33229
67	Полипептид	HC mAb33229
68	ДНК	LC mAb33229
69	Полипептид	LC mAb33229
70	ДНК	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR (костимулирующий домен 4-1BB) с полноразмерным 33229

71	Полипептид	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR (костимулирующий домен 4-1BB) с полноразмерным 33229
72	ДНК	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR (костимулирующий домен CD28) с полноразмерным 33229
73	Полипептид	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR (костимулирующий домен CD28) с полноразмерным 33229
74	Полипептид	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен CD28) с полноразмерным 31345*
75	ДНК	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен CD28) с полноразмерным 31345*
76	Полипептид	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен 4-1BB) с полноразмерным 31345 с последовательностью P2A/GFP
77	Полипептид	Нацеленный на HLA-A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен

		CD28) с полноразмерным 31345 с последовательностью P2A/GFP
78	Полипептид	Нацеленный на HLA- A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен 4-1BB) с полноразмерным 31345* с последовательностью P2A/GFP
79	Полипептид	Нацеленный на HLA- A2/MAGE-A4 ₂₈₆₋₂₉₄ CAR (костимулирующий домен CD28) с полноразмерным 31345* с последовательностью P2A/GFP
80	Полипептид	Нацеленный на HLA- A2/MAGE-A4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR (костимулирующий домен 4-1BB) с полноразмерным 33229 с последовательностью P2A/GFP
81	Полипептид	Нацеленный на HLA- A2/MAGE-A4 ₂₃₀₋₂₃₉ CAR (костимулирующий домен CD28) с полноразмерным 33229 с последовательностью P2A/GFP

АННОТИРОВАННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

[0231] В следующих аннотированных последовательностях части идентифицируют чередованием неподчеркнутых и подчеркнутых частей, а порядок частей соответствует

порядку, указанному под каждой последовательностью (т. е. первая неподчеркнутая часть представляет собой VL, следующая подчеркнутая часть представляет собой (G4S)₃, следующая неподчеркнутая часть представляет собой VH, и так далее).

MAGEA4(286-294) 31345 VL-VH BBz CAR P2A-GFP (SEQ ID NO: 76)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIKGGGGSGGGG
SGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSEYYMTWIRQAPGQGLEWVSYISS
 SGFNIIYADSVKGRFTISRDNANKNSLFLQMNSLRVEDTAVYYCAREGVTDGMDVWGQ
 GTTVTVSSGGGGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
 WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP
 PRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGE
GDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGY
VQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYI
MADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDP
NEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

VL

(G4S)₃

VH

G4S

Шарнир/ТМ CD8

Костимулирующий домен 4-1BB

CD3Z

P2A/GFP

MAGEA4 (286-294) 31345 VL-VH шарнир/ТМ CD28/цито-CD3z CAR P2A-GFP (SEQ ID NO: 77)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIKGGGGSGGGG
SGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSEYYMTWIRQAPGQGLEWVSYISS
 SGFNIIYADSVKGRFTISRDNANKNSLFLQMNSLRVEDTAVYYCAREGVTDGMDVWGQ
 GTTVTVSSGGGGSIEVMPYPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVG
GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYR
SRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRG
 SGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGD
 ATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQ
 ERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIM
 ADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN
 EKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

VL

(G4S)3

VH

G4S

Шарнир CD28

TM CD28

Костимулирующий домен CD28

CD3Z

P2A/GFP

MAGEA4(286-294) 31345* VL-VH BBz CAR P2A-GFP (SEQ ID NO: 78)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIKRGGGGSGGG
GSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSEYYMTWIRQAPGQGLEWVSYI
 SSSGFNIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLFLQMNSLRVEDTAVYYCAREGVTDGMDVWG
 QGTTVTVSSGGGGSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPGEMGGKPRRK
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
 LPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGE
GEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPE
GYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN
VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS
KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

VL

(G4S)3

VH

G4S

Шарнир/TM CD8

Костимулирующий домен 4-1BB

CD3Z

P2A/GFP

**MAGEA4(286-294) 31345* VL-VH шарнир/TM CD28/цито-CD3z CAR P2A-GFP
 (SEQ ID NO: 79)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIKRGGGGSGGG
GSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSEYYMTWIRQAPGQGLEWVSYI
 SSSGFNIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLFLQMNSLRVEDTAVYYCAREGVTDGMDVWG
 QGTTVTVSSGGGGSI~~EV~~MYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLLVV
GGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLSHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY
RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQ

EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEG
DATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYV
QERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYI
MADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDP
NEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

VL

(G4S)3

VH

G4S

Шарнир CD28

TM CD28

Костимулирующий домен CD28

CD3Z

P2A/GFP

MAGEA4(230-239) 33229 VL-VH BBz CAR P2A-GFP (SEQ ID NO: 80)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKRGKAPKLLIYDASILET
GVPSRFGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYFCQQFDNVPLTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGS
GGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIS
WNSGSIAYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRSEDTALYHCAKDWRRRTNYYGMD
VWGQGTTVTVSSGGGGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQUALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFS
VSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSA
MPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN
SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQS
ALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

VL

(G4S)3

VH

G4S

Шарнир/ТМ CD8

Костимулирующий домен 4-1BB

CD3Z

P2A/GFP

MAGEA4(230-239) 33229 VL-VH шарнир/ТМ CD28/цито-CD3z CAR P2A-GFP
(SEQ ID NO: 81)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKRGKAPKLLIYDASILET

GVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLQPEDIATYFCQQFDNVPLTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGS
 GGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIS
 WNSGSIAYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRSEDTALYHCAKDWRRNTNYYGMD
 VWGQGTTVTVSSGGGGSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVL
 VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF
 AAYRSRVKFSRSADAPAYQQGONQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
 LPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGE
 GEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPE
 GYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGLTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN
 VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS
 KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

VL

(G4S)3

VH

G4S

Шарнир CD28

TM CD28

Костимулирующий домен CD28

CD3Z

P2A/GFP

[0232] Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Напротив, разные модификации изобретения, помимо тех, что описаны в настоящем документе, станут очевидными специалистам в данной области техники после изучения приведенного выше описания. Предполагается, что указанные модификации включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Специфический для ассоциированного с меланомой антигена A4 (MAGE-A4) химерный антигенный рецептор (CAR), причем указанный специфический для MAGE-A4 химерный антигенный рецептор взаимодействует с аминокислотами 286-294, или его частью из SEQ ID NO: 32, и при этом указанный специфический для MAGE-A4 CAR специфически связывается с HLA-связанным полипептидом MAGE-A4.

2. Специфический для ассоциированного с меланомой антигена A4 (MAGE-A4) химерный антигенный рецептор (CAR), причем указанный специфический для MAGE-A4 химерный антигенный рецептор взаимодействует с аминокислотами 230-239, или его частью из SEQ ID NO: 32, и при этом указанный специфический для MAGE-A4 CAR специфически связывается с HLA-связанным полипептидом MAGE-A4.

3. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что указанный специфический для MAGE-A4 CAR включает от N-конца к C-концу: (a) внеклеточный лиганд-связывающий домен, содержащий антигенсвязывающий домен к MAGE-A4; (b) шарнир; (c) трансмембранный домен; и (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен и сигнальный домен.

4. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 3, отличающийся тем, что внеклеточный лиганд-связывающий домен содержит домен переменный фрагмент одноцепочечной цепи (scFv) к MAGE-A4, содержащий переменную область легкой цепи (LCVR) и переменную область тяжелой цепи (HCVR).

5. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 4, отличающийся тем, что домен scFv к MAGE-A4 содержит первый линкер между LCVR и HCVR.

6. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-5, дополнительно содержащий второй линкер между внеклеточным лиганд-связывающим доменом и шарниром.

7. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 6, отличающийся тем, что первый линкер и второй линкер включают аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-26.

8. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 7, отличающийся тем, что первый линкер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, а второй линкер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

9. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что шарнир, трансмембранный домен или оба взяты из полипептида CD8 α .

10. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что костимулирующий домен включает костимулирующий домен 4-1BB.

11. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что шарнир, трансмембранный домен или оба взяты из полипептида CD28.

12. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 11, отличающийся тем, что костимулирующий домен включает костимулирующий домен CD28.

13. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-12, отличающийся тем,

что сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета.

14. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1 или 3-13, отличающийся тем, что LCVR содержит определяющие комплементарность области (CDR) LCVR, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

15. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1 или 3-13, отличающийся тем, что LCVR содержит определяющие комплементарность области (CDR) LCVR, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

16. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 14 или п. 15, отличающийся тем, что LCVR содержит LCDR1-LCDR2-LCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12-14-16, соответственно.

17. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1 или 3-16, отличающийся тем, что HCVR содержит CDR HCVR, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

18. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 17, отличающийся тем, что HCVR содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4-6-8, соответственно.

19. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1 или 3-18, отличающийся тем, что LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность, имеющую 95-99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10; и HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, имеющую 95-99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2.

20. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1 или 3-18, отличающийся тем, что LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или аминокислотную последовательность, имеющую 95-99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 37; и HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, имеющую 95-99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2.

21. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 19 или п. 20, отличающийся тем, что LCVR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, а HCVR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

22. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 19 или п. 20, отличающийся тем, что LCVR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, а HCVR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

23. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 2-13, отличающийся тем, что LCVR содержит определяющие комплементарность области (CDR) LCVR, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59.

24. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 23, отличающийся тем, что LCVR содержит LCDR1-LCDR2-LCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 61-63-65, соответственно.

25. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 2-13 или 23-24, отличающийся тем, что HCVR содержит CDR HCVR, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51.

26. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 25, отличающийся тем, что HCVR содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53-55-57, соответственно.

27. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 2-13 или 23-26, отличающийся тем, что LCVR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 или аминокислотную последовательность, имеющую 95-99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 59; и HCVR включает SEQ ID NO: 51 или аминокислотную последовательность, имеющую 95-99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51.

28. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 27, отличающийся тем, что LCVR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, а HCVR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51.

29. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-10 и 13-28, отличающийся тем, что шарнир включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

30. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-10 и 13-29, отличающийся тем, что трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

31. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-10 и 13-30, отличающийся тем, что костимулирующий домен 4-1BB включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

32. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-8 и 11-28, отличающийся тем, что шарнир включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

33. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-8, 11-28, и 32, отличающийся тем, что трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

34. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-8, и 11-28, и 32-33, отличающийся тем, что костимулирующий домен CD28 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

35. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что сигнальный домен CD3-дзета включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

36. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.
37. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.
38. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 1, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.
39. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.
40. Специфический для MAGE-A4 CAR по п. 2, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.
41. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1 и 3-22, отличающийся тем, что указанный химерный антигенный рецептор специфически связывается с одной или более аминокислотами в положениях 286-294 SEQ ID NO: 32.
42. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 2-13 и 23-28, отличающийся тем, что указанный химерный антигенный рецептор специфически связывается с одной или более аминокислотами в положениях 230-239 SEQ ID NO: 32.
43. Специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-26, отличающийся тем, что указанный HLA представляет собой HLA-A2.
44. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-43.
45. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 44, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21.
46. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 44, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 38.
47. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 44, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 48.
48. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 44, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 70.
49. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 44, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 72.
50. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 44-49.
51. Вектор по п. 50, отличающийся тем, что вектор представляет собой ДНК-вектор, РНК-вектор, плазмиду, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или ретровирусный вектор.
52. Вектор по п. 51, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой лентивирусный вектор.
53. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 44-49 или вектор по любому из пп. 50-52.
54. Клетка по п. 53, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой человеческую Т-клетку.

55. Сконструированная клетка, содержащая химерный антигенный рецептор по любому из пп. 1-43.

56. Сконструированная клетка по п. 55, которая является иммунной клеткой.

57. Сконструированная клетка по п. 56, отличающаяся тем, что иммунная клетка представляет собой эффекторную иммунную клетку.

58. Сконструированная клетка по п. 57, отличающаяся тем, что иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-лимфоцит.

59. Сконструированная клетка по п. 58, отличающаяся тем, что Т-лимфоцит представляет собой воспалительный Т-лимфоцит, цитотоксический Т-лимфоцит, регуляторный Т-лимфоцит или Т-хелпер.

60. Сконструированная клетка по п. 59, которая представляет собой CD8+ цитотоксический Т-лимфоцит.

61. Сконструированная клетка по любому из пп. 55-60 для применения в лечении злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4.

62. Сконструированная клетка по п. 61, отличающаяся тем, что злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой множественную миелому.

63. Сконструированная клетка по п. 61, отличающаяся тем, что злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой меланому.

64. Сконструированная человеческая Т-клетка, содержащая химерный антигенный рецептор, содержащий от N-конца до C-конца: (a) внеклеточный лиганд-связывающий домен, содержащий домен, одноцепочечный вариабельный фрагмент к MAGE-A4 (scFv), содержащий вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR); (b) шарнир; (c) трансмембранный домен; и (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен 4-1BB или костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3-дзета.

65. Сконструированная человеческая Т-клетка по п. 64, отличающаяся тем, что указанный scFv к MAGE-A4 специфически связывается с одним или более аминокислотными остатками в положениях 286-294 SEQ ID NO: 32.

66. Сконструированная человеческая Т-клетка по п. 64 или п. 65, отличающаяся тем, что домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2/10.

67. Сконструированная человеческая Т-клетка по п. 64 или п. 65, отличающаяся тем, что домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которые включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2/37.

68. Сконструированная человеческая Т-клетка по п. 64, отличающаяся тем, что указанный домен scFv к MAGE-A4 специфически связывается с одним или более аминокислотными остатками в положениях 230-239 SEQ ID NO: 32.

69. Сконструированная человеческая Т-клетка по п. 64 или п. 65, отличающаяся тем, что домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR,

которые включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51/59.

70. Сконструированная человеческая Т-клетка по любому из пп. 64-69, отличающаяся тем, что шарнир включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

71. Сконструированная человеческая Т-клетка по любому из пп. 64-70, отличающаяся тем, что трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

72. Сконструированная человеческая Т-клетка по любому из пп. 64-71, отличающаяся тем, что костимулирующий домен 4-1BB включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

73. Сконструированная человеческая Т-клетка по любому из пп. 64-69, отличающаяся тем, что шарнир включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

74. Сконструированная человеческая Т-клетка по любому из пп. 64-69 и 73, отличающаяся тем, что трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

75. Сконструированная человеческая Т-клетка по любому из пп. 64-69 и 73-74, отличающаяся тем, что костимулирующий домен CD28 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

76. Сконструированная человеческая Т-клетка по любому из пп. 64-75, отличающаяся тем, что сигнальный домен CD3-дзета включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

77. Сконструированная человеческая Т-клетка по п. 64, содержащая химерный антигенный рецептор, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

78. Сконструированная человеческая Т-клетка по п. 65, содержащая химерный антигенный рецептор, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

79. Сконструированная человеческая Т-клетка по п. 65, содержащая химерный антигенный рецептор, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.

80. Сконструированная человеческая Т-клетка по п. 65, содержащая химерный антигенный рецептор, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

81. Сконструированная человеческая Т-клетка по п. 65, содержащая химерный антигенный рецептор, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

82. Фармацевтическая композиция, содержащая генетически модифицированную человеческую Т-клетку и фармацевтически приемлемый носитель, причем генетически модифицированная человеческая Т-клетка содержит химерный антигенный рецептор по любому из пп. 1-43.

83. Фармацевтическая композиция, содержащая сконструированную клетку по любому из пп. 55-63 и фармацевтически приемлемый носитель.

84. Фармацевтическая композиция, содержащая сконструированную человеческую Т-клетку по любому из пп. 64-81 и фармацевтически приемлемый носитель.

85. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 82-84 для применения в лечении злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4.

86. Фармацевтическая композиция по п. 85, отличающаяся тем, злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой множественную миелому.

87. Фармацевтическая композиция по п. 85, отличающаяся тем, что злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой меланому.

88. Применение химерного антигенного рецептора по любому из пп. 1-43, молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 44-49, вектора по любому из пп. 50-52, клетки по п. 53 или п. 54, сконструированной клетки по любому из пп. 55-63, или сконструированной человеческой Т-клетки по любому из пп. 64-81 в производстве лекарственного препарата для лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4.

89. Применение по п. 88, отличающееся тем, что злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой множественную миелому.

90. Применение по п. 88, отличающееся тем, что злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой меланому.

91. Способ повышения активности Т-лимфоцитов у субъекта, включающий введение субъекту Т-лимфоцита, содержащего химерный антигенный рецептор по любому из пп. 1-43.

92. Способ лечения субъекта, имеющего злокачественное новообразование, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества Т-лимфоцитов, содержащих химерный антигенный рецептор по любому из пп. 1-43.

93. Способ стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа на целевую популяцию клеток или ткань у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клеток, генетически модифицированных для экспрессии химерного антигенного рецептора по любому из пп. 1-43.

94. Способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клеток, генетически модифицированных для экспрессии химерного антигенного рецептора из пп. 1-43.

95. Способ по любому из пп. 91-94, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека.

96. Способ по любому из пп. 91-95, отличающийся тем, что субъект имеет множественную миелому, синовиальную саркому, рак пищевода, рак головы и шеи, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак матки, рак желудка, рак шейки матки, рак молочной железы или меланому.

97. Способ по п. 96, отличающийся тем, что субъект имеет множественную миелому.

98. Способ конструирования популяции клеток для экспрессии химерного

антигенного рецептора, включающий:

а) введение в популяцию иммунных клеток молекул нуклеиновых кислот, кодирующих химерный антигенный рецептор по любому из пп. 1-43;

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

(с) выделение указанных иммунных клеток, экспрессирующих указанный химерный антигенный рецептор на поверхности клеток.

99. Способ по п. 98, дополнительно включающий получение указанной популяции иммунных клеток от субъекта до введения указанной молекулы нуклеиновой кислоты.

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

(а) конструирование популяции клеток по п. 99; и

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

101. Способ по п. 100, отличающийся тем, что указанное злокачественное новообразование, экспрессирующее MAGE-A4, представляет собой множественную миелому.

102. Выделенный антигенсвязывающий белок, который конкурирует за связывание со специфическим для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-43.

103. Выделенный антигенсвязывающий белок по п. 102, отличающийся тем, что указанный выделенный антигенсвязывающий белок представляет собой CAR.

104. Выделенный антигенсвязывающий белок, который связывается с тем же эпитопом, что и специфический для MAGE-A4 CAR по любому из пп. 1-43.

105. Выделенный антигенсвязывающий белок по п. 104, отличающийся тем, что указанный выделенный антигенсвязывающий белок представляет собой CAR.

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

(а) связывается с полипептидом MAGE-A4 с EC50 менее около 10^{-9} M;

(b) демонстрирует увеличение выживаемости у животного со злокачественным новообразованием после введения указанному животному по сравнению с сопоставимым животным без указанного введения; и/или

(с) содержит (i) три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с HCVR, указанной в Таблице 1; и (ii) три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с LCVR, указанной в

Таблице 1.

107. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 106, отличающееся тем, что полипептид MAGE-A4 представляет собой полипептид MAGE-A4, связанный с HLA-A2.

108. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 106-107, содержащее HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

109. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 107-108, содержащее LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

110. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 106-109, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 2/10.

111. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 107-108, содержащее LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

112. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 106-108 и 111, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 2/37.

113. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 106-112, содержащее:

- (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
- (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;
- (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;
- (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;
- (e) домен LCDR2, имеющий аминокислоту 14; и
- (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

114. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 106-107, содержащее HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51.

115. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 106, 107 и 114, содержащее LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59.

116. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 106, 107, 114 и 115, содержащее:

- (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53;
- (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;
- (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57;
- (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;
- (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;

и

(f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

117. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 106, 107 и 114-116, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 51/59.

118. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 106-117, которое представляет собой антитело IgG1.

119. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 106-117, которое представляет собой антитело IgG4.

120. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 106-119, которое представляет собой биспецифическое антитело.

121. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 106-120 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

122. Фармацевтическая композиция по п. 121, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит второй терапевтический агент.

123. Фармацевтическая композиция по п. 122, отличающаяся тем, что указанный второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из противоопухолевого агента, стероидов и нацеленных терапевтических средств.

124. Молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR или LCVR антитела по любому из пп. 106-120.

125. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 124.

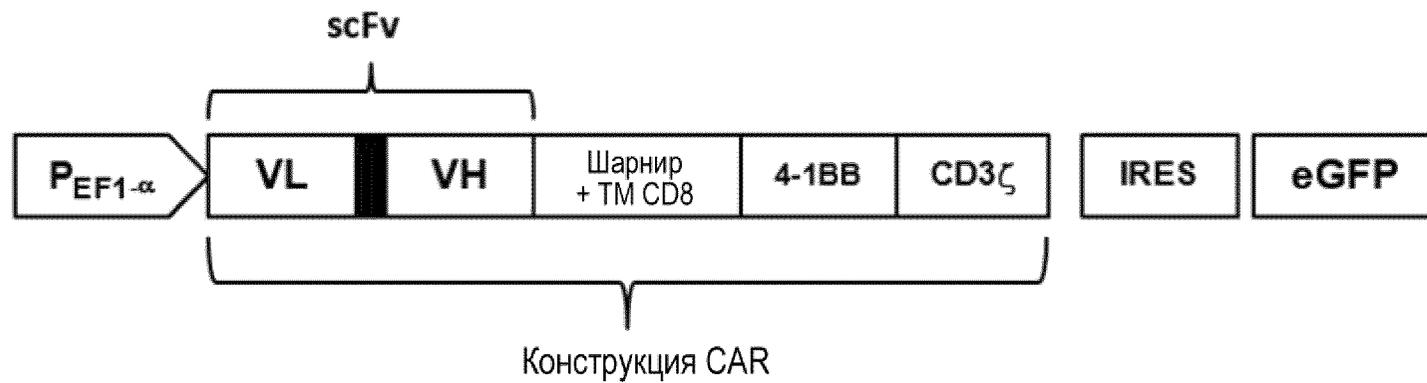
126. Клетка, содержащая вектор по п. 125.

127. Способ лечения злокачественного новообразования, экспрессирующего MAGE-A4, включающий введение субъекту антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 106-120 или фармацевтической композиции по любому из пп. 121-123.

128. Способ по п. 127, отличающийся тем, что указанную фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

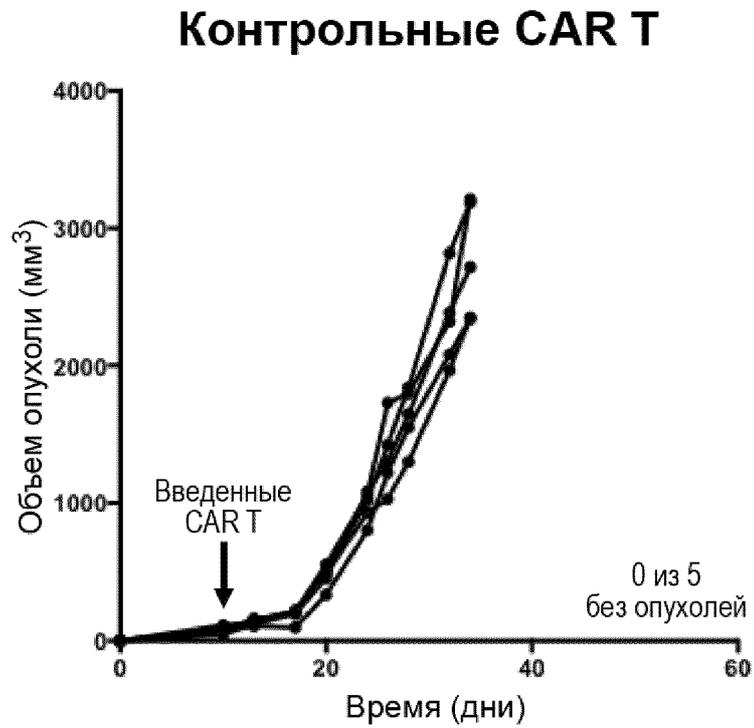
129. Способ по п. 128, отличающийся тем, что указанный второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из противоопухолевого агента, стероидов и нацеленных терапевтических средств.

По доверенности

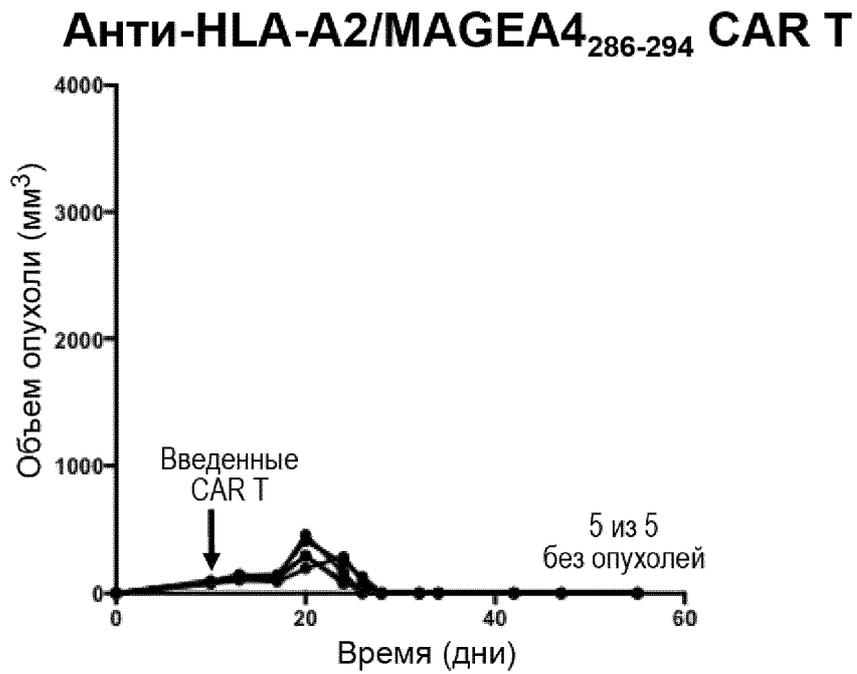


Фиг. 1

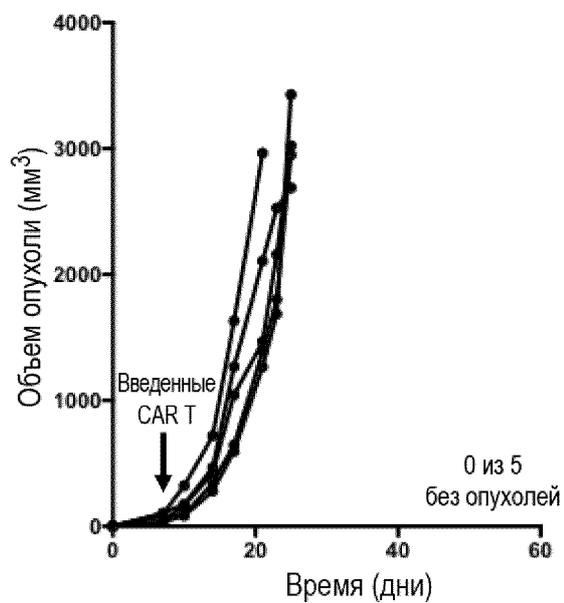
Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 4А

Контрольные CAR T

Фиг. 4В

Анти-HLA-A2/MAGEA4₂₈₆₋₂₉₄ CAR T