

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045097**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.27

(21) Номер заявки
202190607

(22) Дата подачи заявки
2019.07.10

(51) Int. Cl. **C07K 19/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

**(54) ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР ДЛЯ ВСМА НА ОСНОВЕ
ОДНОДОМЕННОГО АНТИТЕЛА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 201810972053.8

(32) 2018.08.24

(33) CN

(43) 2021.05.28

(86) PCT/CN2019/095505

(87) WO 2020/038146 2020.02.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ШЭНЬЧЖЭНЬ ПРЕДЖИН
БАЙОФАРМА КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:
**Чфан Цзихуай, Ли Хунцзянь, Су
Хунчан, Бао Чаолэман, Сун Цзунпэй,
Цай Цинхуа, Дин Ицзинь, Цай Чжибо
(CN)**

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

(56) CN-A-109134665
CN-A-106795217
CN-A-107207598
CN-A-107614008
CN-A-105837693
CN-A-105777911
CN-A-105384825
CN-A-106687483

WU, Wen et al. "A Novel VHH Antibody Targeting the B Cell-Activating Factor for B-Cell Lymphoma" Int. J. Mol. Sci, Vol. vol. 15, 28 May 2014 (2014-05-28), pp. 9481-9496

TAI, Y.T. et al. "Targeting B-cell Maturation Antigen in Multiple Myeloma" Immunotherapy, Vol. 7, No. (11), 31 December 2015 (2015-12-31), pp. 1187-1199

(57) Химерный антигенный рецептор (CAR) и его применение, где CAR включает: ВСМА-связывающий домен, трансмембранный домен, один или более костимулирующих доменов и внутриклеточный сигнальный домен, где ВСМА-связывающий домен содержит определяющие комплементарность участки тяжелой цепи HCDR1-3, и аминокислотные последовательности HCDR1-3 последовательно приведены в SEQ ID NO: 1-3.

B1

045097

**045097
B1**

Область техники

Изобретение относится к области клеточной иммунотерапии, в частности, к ВСМА-специфическому химерному антигенному рецептору на основе однодоменного антитела и его применению.

Уровень техники

Множественная миелома (ММ) представляет собой гематологическое новообразование, развивающееся в костном мозге и характеризующееся накоплением клональных плазматических клеток. Схемы лечения в основном направлены на апоптоз плазматических клеток и/или снижение активности остеокластов (например, химиотерапия, талидомид, леналидомид, дифосфат и/или ингибитор протеасом, такой как бортезомиб (VELCADE®) или карфилзомиб). В настоящее время множественная миелома остается неизлечимым заболеванием. Выживаемость пациентов в течение более пяти лет после постановки диагноза составляет примерно 45%. У многих пациентов возникает рецидив заболевания после прекращения лечения, и 5-летняя выживаемость пациентов после рецидива составляет менее 20%.

В последние годы иммунотерапия Т-клетками с химерными антигенными рецепторами (CART) стала одним из наиболее перспективных методов иммунотерапии опухолей. Химерный антигенный рецептор состоит из одного опухоль-ассоциированного антигенсвязывающего домена, трансмембранного домена, костимулирующего домена и внутриклеточного сигнального домена. При CART-клеточной терапии обычно экспрессируется слитый белок из минимального связывающего фрагмента антитела для распознавания опухоль-ассоциированного антигена (вариабельный одноцепочечный фрагмент или scFv) и последовательности активации Т-клеток на поверхности Т-клеток посредством технологии генной трансдукции. Т-клетки, экспрессирующие молекулы CAR, связываются с опухолевыми антигенами антигензависимым, но не ограниченным МНС образом, специфически индуцируя гибель опухолевых клеток.

Эффективность CART-клеточной терапии зависит от таких свойств, как специфичность антител, распознающих опухоль-ассоциированные антигены, аффинность связывания антигена и т.п. В настоящее время конструирование внутриклеточного сигнального домена CART-клеток достигло успехов, и усилия сконцентрировались и стали ключевыми в конструировании антигенсвязывающего домена в разработке новой CART технологии. Фрагмент с минимальным и единственным функциональным доменом антитела, способный полноценно связываться с антигеном, в антителе из тяжелых цепей альпака (HCAb), а именно вариабельная область антитела из тяжелых цепей, не содержащая легкой цепи (также известная как VHH), имеет простую структуру и молекулярную массу, составляющую примерно 1/10 от молекулярной массы обычного антитела. Его можно эффективно экспрессировать и очистить в экспрессионной системе *in vitro* (например, в *E.coli*, дрожжах, эукариотических клетках и растениях). Он обладает высокой специфичностью, высокой аффинностью, низкой иммуногенностью, хорошей инфильтрацией и имеет возможность контактировать с относительно скрытыми мишенями, с которыми вряд ли могут связаться обычные антитела при лечении опухолей. Основываясь на этих преимуществах, одна из тенденций развития CART-клеточной терапии заключается в использовании однодоменных антител в качестве антигенсвязывающей области CAR для модификации CAR.

В отношении злокачественных В-клеточных новообразований очень важным биомаркером В-клеток является ВСМА (антиген созревания В-клеток). Его РНК почти всегда находят в клетках множественной миеломы, и белок также обнаруживается на поверхности злокачественных плазматических клеток у пациентов с множественной миеломой. ВСМА представляет собой трансмембранный белок типа III, состоящий из 185 аминокислотных остатков, и который относится к суперсемейству рецепторов TNF, и его лиганд принадлежит к суперсемейству TNF, такому как фактор, активирующий В-лимфоцитов (BAFF), лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL). ВСМА может активировать пролиферацию и выживание В-клеток, связываясь с его лигандами. ВСМА высоко экспрессируется на поверхности плазматических клеток и клеток множественной миеломы, но не экспрессируется в гемопоэтических стволовых клетках или других клетках нормальной ткани. Следовательно, ВСМА можно использовать в качестве идеальной мишени для таргетной терапии ММ.

Сущность изобретения

В настоящей заявке сконструировано специфическое однодоменное антитело в качестве антигенсвязывающей области CAR для применения в модификациях CAR и CART-клеточной терапии с использованием средств генной инженерии, и обеспечивается специфический химерный антигенный рецептор (CAR) на основе однодоменного антитела, который включает домен связывания мишени, трансмембранный домен, один или более костимулирующих доменов и внутриклеточный сигнальный домен, где внеклеточный домен представляет собой фрагмент связывания антигена, который может связываться с человеческим ВСМА (антигеном созревания В-клеток).

В одном аспекте настоящая заявка относится к химерному антигенному рецептору (CAR), включающему: ВСМА-связывающий домен, трансмембранный домен, один или более костимулирующих доменов и внутриклеточный сигнальный домен; где ВСМА-связывающий домен включает определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 1 (HCDR1), определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 2 (HCDR2), и определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 3 (HCDR3), где аминокислотная последовательность HCDR1 приведена в SEQ ID NO: 1, аминокислотная последовательность

HCDR2 приведена в SEQ ID NO: 2, и аминокислотная последовательность HCDR3 приведена в SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающий домен представляет собой однодоменное антитело.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающий домен включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, или ее функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает полипептид, полученный из белка, выбранного из группы, состоящей из α -, β - или ζ -цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3e, CD45, CD4, CD5, CD8a, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или ее функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления ВСМА-связывающий домен связан с трансмембранным доменом через шарнирную область.

В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или ее функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления один или более костимулирующих доменов происходят из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKG2C, SLP76, TRIM и ZAP70.

В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3 ζ .

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или ее функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит лидерную последовательность, и лидерная последовательность включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10-11, или ее функциональный вариант.

В еще одном аспекте настоящая заявка относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 12-13, или ее функциональный вариант.

В еще одном аспекте настоящая заявка относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из ДНК-векторов, РНК-векторов, плазмид, лентивирусных векторов, аденовирусных векторов и ретровирусных векторов.

В некоторых вариантах осуществления вектор дополнительно содержит промотор EF1, где промотор EF1 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

В еще одном аспекте настоящая заявка относится к иммунной эффекторной клетке, содержащей CAR, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор.

В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка выбрана из Т-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров (NK).

В еще одном аспекте настоящая заявка относится к способу получения иммунной эффекторной клетки, включающему введение вектора в иммунную эффекторную клетку.

В некоторых вариантах осуществления в способе иммунная эффекторная клетка выбрана из Т-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров (NK).

В еще одном аспекте настоящая заявка относится к композиции, содержащей иммунную эффекторную клетку.

В еще одном аспекте настоящая заявка относится к применению CAR, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или эффекторной иммунной клетки в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией ВСМА.

В еще одном аспекте настоящая заявка относится к CAR, молекуле нуклеиновой кислоты, вектору или иммунной эффекторной клетке для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией ВСМА.

В еще одном аспекте настоящая заявка относится к способу лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией ВСМА, включающего стадию введения субъекту CAR, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или иммунной эффекторной клетки.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение, связанное с экспрессией

BCMA, представляет собой рак или злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение, связанное с экспрессией BCMA, выбрано из группы, состоящей из В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, бластноклеточной плазмацитоидной дендритно-клеточной цитомы, лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественного лимфопролиферативного состояния, MALT-лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии и миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, плазмоцитомы, плазмоцитомы дендритно-клеточной цитомы, макроглобулинемии Вальденстрема, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака легких, миеломы, MGUS, плазмоцитомы, системного амилоидоза, вызванного аномальными легкими цепями, образующими амилоидные отложения, и синдрома POEMS.

Инновации и положительные эффекты настоящей заявки.

Автор изобретения сконструировал однодоменное антитело, содержащее специфическую аминокислотную последовательность, с использованием средств генной инженерии, и сконструировал химерный антигенный рецептор (CAR), используя однодоменное антитело в качестве связывающего домена (BCMA-связывающего домена). В ходе исследований было установлено, что иммунные клетки (например, CART-клетки), содержащие химерный антигенный рецептор, обладают высокой способностью к киллингу и специфичностью по отношению к ассоциированным опухолям. В частности, CAR эффективно трансфектирует Т-лимфоциты здорового человека *in vitro* и оказывает сильный киллинговый эффект на BCMA-положительных клетках-мишенях; и в экспериментах *in vivo* он также демонстрирует сильный киллинговый эффект: воспроизведена мышьячная модель первичной миеломы для обнаружения с использованием клеток MM.1S, трансфектированных люциферазой, и через 3 суток после введения большая часть флуоресценции исчезает, что указывает на то, что клетки CART обладают высоким терапевтическим действием *in vivo*.

Более того, иммунные клетки, содержащие химерный антигенный рецептор по настоящей заявке, демонстрируют отличное нацеливание *in vitro*. Они обладают очень высокой способностью к киллинговому эффекту на клетках, которые являются положительными на экспрессию BCMA, и по существу не обладают киллинговым эффектом на клетках, которые не экспрессируют BCMA. Кроме того, они также демонстрируют отличное нацеливание на опухоль в экспериментах *in vivo*.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 приведены результаты проточной цитометрии экспрессии химерного антигенного рецептора в иммунных клетках, содержащих химерный антигенный рецептор по настоящей заявке.

На фиг. 2 приведены результаты проточной цитометрии уровня экспрессии BCMA на поверхности клеток множественной миеломы MM.1S (левая панель) и клеток миелоидного лейкоза K562 (правая панель).

На фиг. 3А-3В приведены результаты оценки киллинга клеток-мишеней после совместной инкубации опухолевых клеток и иммунных клеток, содержащих химерный антигенный рецептор по настоящей заявке.

На фиг. 4А-4В приведены результаты определения уровня цитокинов в супернатанте методом ELISA после совместной инкубации опухолевых клеток и иммунных клеток, содержащих химерный антигенный рецептор по настоящей заявке.

На фиг. 5 приведены результаты оценки обработки мышей, несущих опухоли, иммунными клетками, содержащими химерный антигенный рецептор по настоящей заявке.

На фиг. 6 приведены результаты оценки обработки мышей, несущих опухоли, иммунными клетками, содержащими химерный антигенный рецептор по настоящей заявке.

Подробное описание изобретения

Автор изобретения сконструировал специфическое однодоменное антитело в качестве антигенсвязывающей области CAR для модификации CAR и CART-клеточной терапии средствами генной инженерии и обеспечил специфический химерный антигенный рецептор (CAR) на основе однодоменного антитела, включающий внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, где внеклеточный домен представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, который может связываться с человеческим BCMA (антигеном созревания В-клеток), выбранный из однодоменного антитела альпака (sdAb, наноантитело).

В рамках настоящей заявки, термин "CDR" обычно относится к определяющему комплементарности участку, который в основном ответственен за связывание с эпитопами антигенов. CDR тяжелой цепи обычно называются HCDR1, HCDR2 и HCDR3, которые последовательно нумеруются от N-конца. В рамках настоящей заявки, CDR можно определить или идентифицировать обычными методами, например, в соответствии с методом, описанным в публикации Kabat et al. (Wu T.T. and Kabat E.A., J. Exp. Med., 132 (2): 211-50, (1970); Borden P. and Kabat E.A., PNAS, 84: 2440-2443 (1987), или методом, описанным в публикации Chothia et al. (Chothia C. and Lesk A.M., J. Mol. Biol., 196 (4): 901-917(1987)).

В рамках настоящей заявки, термин "однодоменное антитело (sdAb)" обычно относится к фрагменту антитела, состоящему из варибельной области тяжелой цепи антитела (область VH) или варибельной области легкой цепи антитела (область VL) (Holt L. et al., *Trends in Biotechnology*, 21 (11): 484-490), которое также известно как нанотело. Однодоменное антитело имеет молекулярную массу всего примерно 12-15 кДа. Первое однодоменное антитело, также известное как "сегмент VHH", было получено генной инженерией из антитела из тяжелых цепей альпака. В настоящей заявке однодоменное антитело может представлять собой однодоменное антитело альпака. Например, сегмент VHH может относиться к известной минимальной антигенсвязывающей единице антитела из тяжелых цепей (Koch-Nolte et al., *FASEB J.*, 21: 3490-3498 (2007)).

В рамках настоящей заявки, термин "трансмембранный домен" можно использовать взаимозаменяемо с "трансмембранной областью (сокращенно, ТМ)", и он относится к части CAR, которая сливает внеклеточный связывающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом и "закоривает" CAR к плазматической мембране иммунных эффекторных клеток. Трансмембранный домен можно получить из встречающихся в природе белков или получить синтезом, полусинтезом или рекомбинацией. Домен ТМ может включать, по меньшей мере, трансмембранный домен следующих белков: α -, β - или ζ -цепи Т-клеточного рецептора, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 и PD1. В рамках настоящей заявки, трансмембранный домен может включать полипептид, полученный из белка, выбранного из α -, β - или ζ -цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154.

В рамках настоящей заявки, термин "внутриклеточный сигнальный домен" обычно является частью CAR, который участвует в трансдукции информации об эффективном связывании анти-BCMA CAR с полипептидом BCMA человека во внутреннюю часть иммунных эффекторных клеток, для запуска функции эффекторных клеток, например активации, продукции цитокинов, пролиферации и цитотоксической активности, включая высвобождение цитотоксических факторов к CAR-связывающим клеткам-мишеням, или другие клеточные ответы, индуцированные связыванием антигенов с внеклеточным доменом CAR. В рамках настоящей заявки, внутриклеточный сигнальный домен может включать сигнальный домен CD3 ϵ .

В рамках настоящей заявки, термин "BCMA" обычно относится к зрелому клеточному антигену, который относится к члену супер семейства рецепторов фактора некроза опухоли (см. Thompson et al., *J. Exp. Medicine*, 192 (1): 129-135, 2000). BCMA может связываться с факторами, активирующими В-клетки (BAFF) и лигандами, индуцирующими пролиферацию (APRIL) (см. Kalled et al., *Immunological Reviews*, 204: 43-54, 2005). Сообщалось, что в незлокачественных клетках BCMA в основном экспрессируются в субпопуляции плазматических клеток и зрелых В-клетках (см. Laabi et al., *EMBO J.*, 77 (1): 3897-3904, 1992; Laabi et al., *Nucleic Acids Res.*, 22 (7): 1147-1154, 1994; Kalled et al., 2005; O'Connor et al., *J. Exp. Medicine*, 199 (1): 91-97, 2004; и Ng et al., *J. Immunol.*, 73 (2): 807-817, 2004). РНК BCMA обычно обнаруживают в клетках множественной миеломы и других лимфомах, и некоторые исследователи обнаружили белок BCMA на поверхности плазматических клеток у пациентов с множественной миеломой (см. Novak et al., *Blood*, 103 (2): 689-694, 2004; Neri et al., *Clinical Cancer Research*, 73 (19): 5903-5909, 2007; Bellucci et al., *Blood*, 105 (10): 3945-3950, 2005; и Moreaux et al., *Blood*, 703 (8): 3148-3157, 2004). Таким образом, BCMA можно использовать в качестве потенциальной терапевтической мишени для лечения злокачественных опухолей (например, множественной миеломы).

В рамках настоящей заявки, термин "BCMA-связывающий домен" обычно относится к гуманизованному анти-BCMA антителу, которое может специфически связываться с полипептидом BCMA, экспрессированным на В-клетках, или его антигенсвязывающему фрагменту. В рамках настоящей заявки, связывающий домен может происходить из природных источников, синтетических источников, полусинтетических источников или рекомбинантных источников. В рамках настоящей заявки, внеклеточный связывающий домен может включать анти-BCMA антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Из них "антитело" может представлять собой полипептид, включающий, по меньшей мере, варибельную область легкой цепи или тяжелой цепи иммуноглобулина, который специфически распознает и связывается с эпитопом антигена (например, BCMA), таким как содержащие антигенную детерминанту пептиды, липиды, полисахариды или нуклеиновые кислоты (например, те, которые распознаются иммунными клетками).

В рамках настоящей заявки, термин "костимулирующий домен" обычно относится к внутриклеточному сигнальному домену костимулирующей молекулы. Например, костимулирующая молекула может представлять собой молекулу клеточной поверхности, отличную от рецептора антигена или Fc-рецептора, которая может обеспечивать второй сигнал, необходимый для эффективной активации и функций Т-лимфоцитов. Например, костимулирующий домен может быть выбран из группы, состоящей из CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70.

В рамках настоящей заявки, термин "шарнирная область" обычно относится к домену в химерном антигенном рецепторе, который располагает связывающий домен от поверхности эффекторных клеток, чтобы он играл надлежащую роль в клетка/клеточном контакте, связывании антигена и активации. В рамках настоящей заявки, шарнирная область может располагаться между связывающим доменом и трансмембранным доменом. Шарнирная область может происходить из природных источников, синтетических источников, полусинтетических источников или рекомбинантных источников. Шарнирная область может содержать аминокислотную последовательность встречающейся в природе шарнирной области иммуноглобулина или искусственно модифицированной (включая делецированную, замененную или вставленную) шарнирной области иммуноглобулина.

В рамках настоящей заявки, термин "лидерная последовательность" обычно относится к последовательности, расположенной перед кодирующей областью структурного гена, которая может транскрибироваться, но не может транслироваться. В настоящей заявке лидерная последовательность может начинаться от 5'-конца до первого кода гена, кодирующего химерный антигенный рецептор. В рамках настоящей заявки, лидерная последовательность включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее функциональный вариант.

В рамках настоящей заявки, термин "функциональный вариант" обычно относится к аминокислотной последовательности, имеющей по существу такие же функции с ней (например, обладающей свойствами химерного антигенного рецептора) и имеющей, по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 85%, 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% или, по меньшей мере 100%) идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант аминокислотной последовательности представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую по существу такие же функции с ней (например, обладающую свойствами химерного антигенного рецептора), и включающую одно или более (например, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10 или более) из замен, делеций или добавлений аминокислот на основе аминокислотной последовательности.

В рамках настоящей заявки, термин "лентивирусный вектор" обычно относится к вектору геномной терапии, разработанному на основе вируса. В рамках настоящей заявки, вирус может представлять собой вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вирус инфекционной анемии лошадей (EIA) или вирус иммунодефицита кошек (FIV). Лентивирусный вектор обладает способностью инфицировать как митотические клетки, так и немитотические клетки, может эффективно инфицировать почти все клетки млекопитающих, включая нейроны, гепатоциты, кардиомиоциты, опухолевые клетки, эндотелиальные клетки, стволовые клетки и т.п., и имеет высокую эффективность инфицирования.

В рамках настоящей заявки, термин "промотор EF1" обычно относится к промотору, который может постоянно поддерживать транскрипцию регулируемого гена-мишени на определенном уровне. В рамках настоящей заявки, промотор EF1 может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14. В рамках настоящей заявки, уровень экспрессии химерного антигенного рецептора, регулируемый промотором EF1, может подвергнуться повышающей или понижающей регуляции не более чем на 5%, не более чем на 4%, не более чем на 3%, не более чем на 2%, не более чем на 1%, не более чем 0,5%, не более чем 0,1%, не более чем 0,01% или менее. В рамках настоящей заявки, промотор EF1 может располагаться выше нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор.

В рамках настоящей заявки, термин "Т-лимфоциты" обычно относится к клеткам, которые включают тимоциты, незрелые Т-лимфоциты, зрелые Т-лимфоциты, Т-лимфоциты в состоянии покоя или активированные Т-лимфоциты. Т-клетки могут представлять собой хелперные Т (Th)-клетки, такие как хелперные Т1 (Th1) клетки или хелперные Т2 (Th2) клетки. Т-клетки могут быть хелперными Т-клетками (HTL; CD4+Т-клетки), CD4 Т-клетками, цитотоксическими Т-клетками (CTL; CD8+Т-клетки), CD4+CD8+Т-клетками или CD4⁺CD8⁺Т-клетками. Альтернативно, Т-лимфоциты могут включать нативные Т-клетки и Т-клетки памяти.

В рамках настоящей заявки, термин "естественные клетки-киллеры" обычно относится к субпопуляции лейкоцитов, которые являются компонентом врожденной иммунной системы. NK-клетки играют важную роль в отторжении у хозяина опухолей и инфицированных вирусом клеток. NK-клетки обладают цитотоксичностью и индуцируют апоптоз. NK-клетки можно использовать для подавления вирусной инфекции и продукции антигенспецифических цитотоксических Т-клеток посредством адаптивного иммунного ответа, тем самым элиминируя инфекцию.

В рамках настоящей заявки, термин "опухоль" обычно относится к новому аномальному разрастанию, которое развивается в результате клональной аномальной пролиферации определенной клетки в локальной ткани, которая теряет нормальную регуляцию роста на уровне гена под действием различных канцерогенных факторов. Ее также называют новообразованием, потому что такое новообразование в основном представляет собой массивные узелковые образования. В рамках настоящей заявки, рак может включать плоскоклеточную карциному, рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого), перитонеальную карци-

ному, гепатоцеллюлярную карциному, карциному желудка или рак желудка (включая рак желудочно-кишечного тракта), рак поджелудочной железы, глиобластома, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак печени, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия или матки, рак слюнной железы, рак почки или почечноклеточный рак, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, рак печени, рак головы и шеи, В-клеточную лимфому (включая низкодифференцированную/фолликулярную NHL; мелкоклеточную лимфоцитарную (SL) NHL; промежуточную/фолликулярную NHL, диффузную NHL с промежуточной дифференцировкой клеток; иммунобластную NHL высокой степени злокачественности; лимфобластную NHL высокой степени злокачественности; NHL из мелких клеток с нерасщепленными ядрами высокой степени злокачественности, лимфому, ассоциированную со СПИДом, макроглобулинемию Вальденстрема, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), волосатоклеточный лейкоз, хронический миелобластоз и посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание (PTLD). В рамках настоящей заявки, рак может включать рак или злокачественные опухоли, связанные с экспрессией ВСМА. Например, рак может быть выбран из группы, состоящей из В-клеточного острого лимфоцитарного лейкоза, Т-клеточного острого лимфоцитарного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, бластноклеточной плазмацитоидной дендритно-клеточной цитомы, лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественного лимфопролиферативного состояния, MALT-лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии и миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, плазмацитоидной дендритно-клеточной цитомы, макроглобулинемии Вальденстрема, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака легких, миеломы, MGUS, плазмцитомы, системного амилоидоза, вызванного аномальными легкими цепями, образующими амилоидные отложения, и синдрома POEMS.

В рамках настоящей заявки, обеспечивается химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий ВСМА-связывающий домен, трансмембранный домен, один или более костимулирующих доменов и внутриклеточный сигнальный домен, где ВСМА-связывающий домен включает определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 1 (HCDR1), определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 2 (HCDR2), и определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 3 (HCDR3), где аминокислотная последовательность HCDR1 приведена в SEQ ID NO: 1, аминокислотная последовательность HCDR2 приведена в SEQ ID NO: 2, и аминокислотная последовательность HCDR3 приведена в SEQ ID NO: 3.

В рамках настоящей заявки, ВСМА-связывающий домен может связываться или ассоциироваться с ВСМА с K_a (т.е. константой равновесия ассоциации связывающего взаимодействия при 1/М), больше или равной примерно 10^5 M^{-1} (например, выше или равной примерно 10^5 M^{-1} , выше или равной примерно 10^6 M^{-1} , выше или равной примерно 10^7 M^{-1} , выше или равной примерно 10^8 M^{-1} , выше или равной примерно 10^9 M^{-1} , выше или равной примерно 10^{10} M^{-1} , выше или равной примерно 10^{11} M^{-1} , выше или равной примерно 10^{12} M^{-1} , выше или равной примерно 10^{13} M^{-1} или выше), или с константой равновесия диссоциации K_d ниже или равной примерно 10^{-5} M (например, ниже или равной примерно 10^{-5} M , ниже или равной примерно 10^{-6} M , ниже или равной примерно 10^{-7} M , ниже или равной примерно 10^{-8} M , ниже или равной примерно 10^{-9} M , ниже или равной примерно 10^{-10} M , ниже или равной примерно 10^{-11} M , ниже или равной примерно 10^{-12} M , ниже или равной примерно 10^{-13} M или ниже).

В рамках настоящей заявки, аффинность между ВСМА-связывающим доменом и ВСМА можно определить обычными методами, используемыми в данной области, например, конкурентным ELISA (твердофазный иммуоферментный анализ), или ассоциацией связывания или анализом замещения с использованием меченых лигандов, или с использованием поверхностного плазмонного резонанса (такого как Biacore T100, который можно получить от Biacore, Inc., Piscataway, NJ) или технологии оптических биосенсоров.

В рамках настоящей заявки, ВСМА-связывающий домен может представлять собой однодоменное антитело. ВСМА-связывающий домен, подходящий для конструирования химерного антигенного рецептора по настоящей заявке, включает, не ограничиваясь этим, аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, или ее функциональный вариант. Из них функциональный вариант выбран из группы, состоящей из белков или полипептидов, образованных заменой, делецией или добавлением одной или более аминокислот в ВСМА-связывающем домене; и белков или полипептидов, имеющих 90% или более (например, по меньшей мере, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или больше) гомологию последовательности с ВСМА-связывающим доменом.

В настоящей заявке трансмембранный домен может включать полипептид, полученный из белка, выбранного из группы, состоящей из α -, β - или ζ -цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 ζ , CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В рамках настоящей заявки, трансмембранный домен может происходить из трансмембранного домена CD8 α . В

рамках настоящей заявки, трансмембранный домен может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или ее функциональный вариант. Из них функциональный вариант выбран из группы, состоящей из белков или полипептидов, образованных заменой, делецией или добавлением одной или более аминокислот в трансмембранном домене; и белков или полипептидов, имеющих 90% или более (например, по меньшей мере, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или больше) гомологию последовательности с трансмембранным доменом.

В рамках настоящей заявки, ВСМА-связывающий домен может быть связан с трансмембранным доменом через шарнирную область. В рамках настоящей заявки, CAR может содержать одну или более шарнирных областей между ВСМА-связывающим доменом и трансмембранным доменом. Шарнирная область может содержать определенные мутации или замены аминокислот, например, такие, в которых остаток пролина мутирован или заменен другим аминокислотным остатком (например, остатком серина). В рамках настоящей заявки, шарнирная область может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или ее функциональный вариант. Из них функциональный вариант выбран из группы, состоящей из белков или полипептидов, образованных заменой, делецией или добавлением одной или более аминокислот шарнирной области; и белков или полипептидов, имеющих 90% или более (например, по меньшей мере, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или больше) гомологию последовательности с шарнирной областью.

В рамках настоящей заявки, костимулирующий домен может функционировать антигеннезависимым (например, ВСМА-независимым) образом, для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала. В рамках настоящей заявки, CAR может содержать один или более костимулирующих доменов. Множество костимулирующих доменов может повышать эффективность и способность к размножению иммунных клеток (например, Т-клеток и НК-клеток), экспрессирующих CAR. Например, костимулирующий домен может быть связан с С-концом трансмембранного домена. В рамках настоящей заявки, один или более костимулирующих доменов могут происходить из костимулирующей молекулы, выбранной из CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKG2C, SLP76, TRIM и ZAP70. В рамках настоящей заявки, костимулирующий домен может происходить из CD137. В рамках настоящей заявки, костимулирующий домен может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант. Из них функциональный вариант выбран из группы, состоящей из белков или полипептидов, образованных заменой, делецией или добавлением одной или более аминокислот в костимулирующем домене; и белков или полипептидов, имеющих 90% или более (например, по меньшей мере, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или больше) гомологию последовательности с костимулирующим доменом.

В рамках настоящей заявки, внутриклеточный сигнальный домен может преимущественно активироваться TCR (например, комплексом TCR/CD3) антигензависимым образом. В рамках настоящей заявки, внутриклеточный сигнальный домен может происходить из TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В рамках настоящей заявки, внутриклеточный сигнальный домен может включать сигнальный домен CD3 ζ . Например, внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или ее функциональный вариант. Из них функциональный вариант выбран из группы, состоящей из белков или полипептидов, образованных заменой, делецией или добавлением одной или более аминокислот во внутриклеточном сигнальном домене; и белков или полипептидов, имеющих 90% или более (например, по меньшей мере, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или больше) гомологию последовательности с внутриклеточным сигнальным доменом.

В рамках настоящей заявки, CAR может дополнительно включать лидерную последовательность. Например, лидерная последовательность может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее функциональный вариант. Из них функциональный вариант выбран из группы, состоящей из белков или полипептидов, образованных заменой, делецией или добавлением одной или более аминокислот в лидерной последовательности; и белков или полипептидов, имеющих 90% или более (например, по меньшей мере, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или больше) гомологию последовательности с лидерной последовательностью.

В рамках настоящей заявки, CAR может содержать линкер между соответствующими доменами. Например, линкер включается для достижения правильного расстояния и конфигурации между соответствующими доменами. Например, линкер может связывать трансмембранный домен с внутриклеточным сигнальным доменом. В рамках настоящей заявки, линкер может содержать следующие аминокислотные

последовательности: GGG, (GGGGS) n и GGRRGGGS.

В CAR по настоящей заявке трансмембранный домен может происходить из CD8 α , костимулирующий домен может происходить из CD137, и внутриклеточный сигнальный домен может происходить из CD3 ζ .

В рамках настоящей заявки, CAR может содержать ВСМА-связывающий домен, включающий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, трансмембранный домен, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, шарнирную область, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, костимулирующий домен, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, внутриклеточный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и лидерную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

В рамках настоящей заявки, CAR может содержать ВСМА-связывающий домен, включающий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, трансмембранный домен, включающий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, шарнирную область, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, костимулирующий домен, включающий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, внутриклеточный сигнальный домен, включающий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и лидерную последовательность, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

В рамках настоящей заявки, CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10-11, или ее функциональный вариант. Из них функциональный вариант выбран из группы, состоящей из белков или полипептидов, образованных заменой, делецией или добавлением одной или более аминокислот в CAR; и белков или полипептидов, имеющих 90% или более (например, по меньшей мере, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или больше) гомологию последовательности с CAR.

Настоящая заявка относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, которая может кодировать CAR.

В рамках настоящей заявки, молекула нуклеиновой кислоты может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 12-13, или ее функциональный вариант. Например, функциональный вариант может включать полинуклеотид, имеющий, по меньшей мере, примерно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с последовательностью из SEQ ID NO: 12-13 или вариантом, при условии, что она все еще может кодировать CAR.

Настоящая заявка относится к вектору, который может содержать молекулу нуклеиновой кислоты.

В рамках настоящей заявки, вектор может включать одно или более из ориджина репликации, селективного бокса, промотора, энхансера, сигнала инициации трансляции (последовательность Шайна-Дальгарно или последовательность Козака), интрона, последовательности полиаденилирования, 5'- и 3'-нетранслируемой области. Например, вектор может содержать промотор EF1, и промотор EF1 может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14. В рамках настоящей заявки, вектор может быть выбран из плазмид, фагов, искусственных хромосом (например, дрожжевой искусственной хромосомы, YAC) и вируса животных. Например, вектор может быть выбран из ДНК-векторов, РНК-векторов, плазмид, лентивирусных векторов, аденовирусных векторов и ретровирусных векторов.

Настоящая заявка относится к иммунной эффекторной клетке, которая может содержать CAR, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор.

В рамках настоящей заявки, иммунная эффекторная клетка может быть выбрана из Т-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров (NK).

Настоящая заявка относится к способу получения эффекторной иммунной клетки, включающему введение вектора в эффекторную иммунную клетку. Например, CAR вводится и экспрессируется в иммунных клетках для перенацеливания CAR специфически на антиген-мишень (например, ВСМА). В настоящей заявке иммунная эффекторная клетка может быть выбрана из Т-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров (NK). В рамках настоящей заявки, способ может включать стадию получения иммунных эффекторных клеток от субъекта. Например, Т-лимфоциты можно получить из мононуклеарных клеток периферической крови, костного мозга, ткани лимфатических узлов, пуповинной крови, ткани тимуса, ткани из очага инфекции, асцита, плеврального выпота, ткани селезенки и опухоли. Кроме того, способ может дополнительно включать стадию селекции определенной клеточной субпопуляции из иммунной эффекторной клетки. Например, определенная субпопуляция Т-клеток может быть выбрана в соответствии со специфической экспрессией CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA и CD45RO.

Настоящая заявка относится к композиции, которая может содержать эффекторную иммунную

клетку.

В рамках настоящей заявки, композиция может содержать фармацевтически приемлемые носители. Фармацевтически приемлемые носители могут быть выбраны из группы, состоящей из эксципиентов, скользких веществ, подсластителей, разбавителей, консервантов, красок/красителей, усилителей вкуса, поверхностно-активных веществ, смачивающих агентов, диспергаторов, суспендирующих агентов, стабилизаторов, изотонических агентов, растворителей, поверхностно-активных веществ и эмульгаторов.

В рамках настоящей заявки, композиция может дополнительно включать дополнительные активные ингредиенты, такие как одно или более из цитокинов, факторов роста, гормонов, низкомолекулярных химических активных ингредиентов, пролекарств и антител.

В рамках настоящей заявки, количество иммунных эффекторных клеток в композиции может представлять собой эффективное количество. Эффективное количество может представлять собой минимальное количество, при котором можно достичь положительного или желаемого профилактического или терапевтического эффекта. Например, эффективное количество может зависеть от тяжести заболевания, возраста, массы тела, пола или других факторов субъекта.

Настоящая заявка относится к применению CAR, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или эффекторной иммунной клетки в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией ВСМА.

Настоящая заявка относится к CAR, молекуле нуклеиновой кислоты, вектору или иммунной эффекторной клетке для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией ВСМА.

Настоящая заявка относится к способу лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией ВСМА, включая стадию введения субъекту CAR, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или иммунной эффекторной клетки.

В рамках настоящей заявки, заболевание или нарушение, связанное с экспрессией ВСМА, представляет собой рак или злокачественную опухоль. В настоящей заявке заболевание или нарушение, связанное с экспрессией ВСМА, выбрано из группы, состоящей из В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, бластноклеточной плазмацитоидной дендритно-клеточной цитомы, лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественного лимфопролиферативного состояния, MALT-лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии и миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, плазмоцитоидной дендритно-клеточной цитомы, макроглобулинемии Вальденстрема, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака легких, миеломы, MGUS, плазмоцитомы, системного амилоидоза, вызванного аномальными легкими цепями, образующими амилоидные отложения, и синдрома РОEMS.

В рамках настоящей заявки, способ введения лекарственного средства может включать аэрозольную ингаляцию, инъекцию, прием внутрь, инфузию, имплантацию или трансплантацию. Например, инъекция может включать внутрисосудистые, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, внутрисуставные, интраорбитальные, интратуморальные, внутрисердечные, внутрикожные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, субэпидермальные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные и внутримышечные инъекции, или прямую инъекцию в опухоль или лимфатический узел.

Далее настоящая заявка дополнительно иллюстрируется подробными примерами. Следует понимать, что следующие примеры предназначены только для иллюстрации настоящей заявки и не ограничивают содержание изобретения.

Примеры.

Пример 1. Получение гена VHH однодоменного анти-ВСМА антитела.

1) Создание библиотеки однодоменных анти-ВСМА антител.

Здоровых взрослых альпаков иммунизировали многократными подкожными инъекциями в шею и спину антигеном ВСМА, полученным из Beijing Yiqiao Shenzhou Ltd. При иммунизации антиген и равный объем адьюванта Фрейнда смешивали для 4-6 иммунизации. Следили за всасыванием введенной массы в местах инъекций и наблюдали для подтверждения правильности иммунизации. Интервал между иммунизациями составлял 7-15 суток. После четвертой иммунизации отбирали образцы крови для определения иммунного титра к антигену. Когда титр достигал более 10000 (метод ELISA), то отбирали образец крови (примерно 100 мл) для выделения лимфоцитов для экстракции РНК, которую обратно транскрибировали в кДНК. Фрагмент варибельной области VHH антитела из тяжелых цепей альпака дважды амплифицировали с помощью ПЦР. Фрагмент VHH был сконструирован в библиотеке фагового дисплея, и продукт фрагмента гена, несущего однодоменное антитело, трансформировали в компетентные клетки, с получением иммунной библиотеки однодоменных антител.

2) Скрининг однодоменного анти-ВСМА антитела.

Молекулы однодоменных антител экспонировали на поверхности фага с помощью технологии фа-

гового дисплея, и затем скринировали для получения антигенспецифических однодоменных антител. С помощью фагового твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA) антиген разбавляли 100 мМ NaHCO₃ (pH 8,0) до конечной концентрации 100 мкг/мл, и 100 мкл покрывали 96-луночный планшет, выдерживали в течение ночи при 4°C. После промывания PBS и покрытия 1% обезжиренным молоком фаги добавляли для инкубации в течение 1-2 ч. Затем элюировали антигенспецифические фаги и инфицировали клетки TG1, которые помещали и культивировали в культуральный планшет со средой LB, содержащей ампициллин. С помощью нескольких раундов скрининга постепенно достигалось концентрирование. Для определения ELISA было отобрано большое количество положительных клонов, и положительные клоны секвенировали. По данным выравнивания последовательностей идентифицировали уникальные клоны и разделяли на каркасную область (FR) и определяющий комплементарность участок (CDR).

Клоны с правильными результатами секвенирования инокулировали в 5 мл среды LB, содержащей ампициллин, и культивировали в течение ночи при 37°C на шейкере. 1 мл бактериального раствора инокулировали в 300 мл среды LB и культивировали при 37°C на шейкере до OD_{600 нм}=0,6-0,9. Добавляли 1М IPTG и культивировали в течение ночи при 28°C на шейкере. Бактерии собирали центрифугированием. Сырой экстракт антитела получали осмотическим методом. Однодоменное антитело метили ProteinL и очищали с помощью аффинной хроматографии с выходом более 10 мг/л. Аффинность антитела определяли с помощью технологии SPR для дальнейшего скрининга однодоменных антител с высокой специфичностью. Согласно вышеуказанному варианту осуществления в целом было получено 6 однодоменных анти-BCMA антител, и было выбрано однодоменное антитело с более высокой аффинностью.

Из них одно однодоменное анти-BCMA антитело было названо BCMA sdAb I. Посредством секвенирования было установлено, что аминокислотные последовательности HCDR1-3 BCMA sdAb I представляют таковые, последовательно представленные в SEQ ID NO: 1-3.

Пример 2. Конструирование вектора гена химерного антигенного рецептора.

Два генных сегмента синтезировали в Taihe Biotechnology Co., Ltd. Один из них представляет собой нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15, которая находится в BCMA sdAb I, полученном в примере 1; и другая представляет собой сконструированный структурный ген CAR поколения 2 (шарнирная область CD8a, трансмембранный домен+костимулирующий домен 4-1BB+внутриклеточный сигнальный домен CD3ζ, и нуклеотидная последовательность, кодирующая структурный ген CAR поколения 2, содержащий эти домены, представляет последовательность, показанную в SEQ ID NO: 16). После получения синтетического гена проводили молекулярное клонирование для конструирования BCMA-специфического CAR. Продукты ПЦР с последовательностями SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 получали с помощью ПЦР. ПЦР с перекрывающимися праймерами использовали для получения гена BCMA CAR, связыванием двух фрагментов (его нуклеотидная последовательность представлена в SEQ ID NO: 12). Лентивирусный вектор Pre и ген BCMA CAR ферментативно расщепляли, связывали и трансформировали. Собирали клоны и экстрагировали плазмиды. Проводили секвенирование для подтверждения правильной последовательности лентивирусного вектора Pre-Lenti-EF1-BCMA.

1) SEQ ID NO: 15:

```
atggcctaccagtgaccgcctgctcctgcccgtgacctgctccacgccgccaggccgaagtccaactccaggcttcc
ggtggcggtctggcacagcctggagggctcctgcccgtcctcctgcccagcaagtggcaggacttcagctactcttatggcctggttcag
acagccacctggcaaaaggcctgaatacgtcggagggttaggtgctgacgggtccctcactacgctgacagtgtaagggctggttc
accattagcagagacaacgctaagaatacagtgctacctgcaaatgaactcactgagagctgaggatactgctgtactctgctgcatctcgc
ggaatcgtgacgggtcagactttgctcctatggacagggcaccaggtgactgtgagttcc
```

2) SEQ ID NO:16:

```
ccagcgaagcccaccacgacgccagcggcggcaccaccaacaccggcggccaccatcgcgtcgcagccctgtccctgcg
cccagaggcgtgcccggccagcggcggggggcgcagtgacacagagggggctggacttcgctgtgatatctacatctggcggcccttg
ggcgggacttggtgggtccttctcctgctcactggtatcacctttactgcaaacggggcagaagaactcctgtatatattcaaaaccatt
tatgagaccagtacaactactcaagaggaagatggctgtagctccgatttccagaagaagaaggaggatgtaactgagagtgaa
gttcagcaggagcgcagacgcccccgctaccagcaggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtac
gatgttttgacaagacgtggcgggaccctgagatgggggaaagccgcagagaaggaagaaccctcaggaaagcctgtacaatg
aactgcagaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcagcggcggggcgaaggggcacgatggccttt
accaggtctcagctacagccaccaaggacacactacagccctcatcagcggccctgccccctcgctaa
```

Пример 3. Получение лентивируса BCMA-специфического химерного антигенного рецептора.

За сутки до упаковки вируса клетки 293T (полученные в ATCC) переваривали трипсином и инокулировали на 10 см чашку из расчета 1×10^7 клеток/чашку. После трансфекции клеток в дополнение к плазмиде Pre-Lenti-EF1-BCMA, полученной в примере 2, каждую плазмиду необходимо было котрансфектировать с упаковочными плазмидами psPAX2, pMD2.0G. Из них использовали 5 мкг Pre-Lenti-EF1-BCMA, 3,75 мкг плазмиды psPAX2 и 1,25 мкг плазмиды pMD2.0G. После трансфекции смесь трех вышеуказанных плазмид добавляли в 500 мкл среды MEM. В отдельную микроцентрифужную пробирку на 25

мкл добавляли реагент Lipofectamine 2000 (липосома) в 500 мкл среды MEM. Затем разбавленный реагент для трансфекции добавляли по каплям над разбавленной плазмидой, хорошо перемешивали, центрифугировали и выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин. Наконец, смесь плазмиды и реагента для трансфекции добавляли на культуральную чашку диаметром 10 см, осторожно встряхивали 10 раз, хорошо перемешивали и помещали в термостат. Через 3 суток трансфекции вирус собирали. 10 мл вирусосодержащего супернатанта культуры переносили в центрифужную пробирку емкостью 50 мл и центрифугировали при 4°C при 1250 об/мин в течение 5 мин для удаления мертвых клеток 293Т. Затем вирусосодержащего супернатант фильтровали, концентрировали, упаковывали и хранили при -80°C для использования.

Пример 4. Получение Т-клеток, модифицированных ВСМА-специфическим химерным антигенным рецептором.

1) Получение Т-лимфоцитов.

В стерильных условиях у добровольцев отбирали 10 мл венозной крови. В центрифужную пробирку емкостью 50 мл добавляли 10 мл изолятов человеческих лимфоцитов (Dakewe Bioengineering Co., Ltd.). Кровь медленно вносили с помощью электрического пистолета-дозатора в центрифужную пробирку, по стенке. Центрифужную пробирку помещали в центрифугу и центрифугировали при 700 g при 22°C в течение 25 мин. После окончания центрифугирования РВМС находятся в белом мембранном слое между верхним слоем плазмы и отделившимся раствором. Белый мембранный слой, как можно полнее, отсасывали в другую центрифужную пробирку с помощью пипетки Пастера (добавляя 30 мл среды 1640). В данном случае нужно быть осторожными, чтобы не отсосать отделившийся раствор. Центрифугировали при 250 g, 22°C, в течение 10 мин. Верхнюю жидкость отбрасывали. Клетки ресуспендировали в 3 мл среды 1640 и подсчитывали для выделения Т-клеток.

1×10^7 клеток помещали в микроцентрифужную пробирку и центрифугировали при 250 g при 22°C в течение 10 мин. Верхнюю жидкость отбрасывали, клеточные осадки ресуспендировали в 80 мкл буфера для разделения магнитными шариками и добавляли 20 мкл CD3MicroBeads (Meitiani). Смесь помещали при 4°C в холодильник на 1 ч для обеспечения достаточного связывания. Через 1 ч в микроцентрифужную пробирку добавляли 1 мл буфера для разделения магнитными шариками и центрифугировали при 250 g при 4°C в течение 10 мин. В течение этого периода готовили колонку для фильтрования, помещали на магнит и промывали 500 мкл буфера (буфер стекал вниз под действием силы тяжести). После центрифугирования супернатант удаляли, и клетки ресуспендировали в 500 мкл буфера. Добавляли колонку, и буфер стекал вниз под действием силы тяжести. После вытекания клеточной суспензии колонку промывали четыре раза 500 мкл буфера. Колонку удаляли с магнита, и Т-клетки промывали 1 мл буфера в микроцентрифужной пробирке на 1,5 мл. Клетки центрифугировали при 250 g при 4°C в течение 10 мин. Клетки ресуспендировали в среде X-vivo 15, содержащей IL2 (Lonza), и инокулировали из расчета 2×10^6 Т-клеток/лунку (в 6-луночном планшете) после подсчета.

2) Инфицирование Т-клеток лентивирусом.

После культивирования в течение ночи для инфицирования в течение ночи добавляли раствор вируса Pre-Lenti-EF1-BCMA с MOI=2, полученный в примере 3. На сутки 2 добавляли 1 мл свежей среды. На сутки 3 Т-клетки были достаточно активированы и быстро пролиферировали. В это время Т-клетки переносили в культуральную колбу емкостью 25 см. На сутки 5 после инфицирования эффективность экспрессии молекул ВСМА CAR на поверхности Т-клеток определяли с помощью биомеченного белка ВСМА Fc для получения ВСМА-специфических CART-клеток. Экспрессию CAR на поверхности клеточной мембраны определяли проточной цитометрией. Результаты анализа проточной цитометрией экспрессии молекул ВСМА CAR на поверхности клеток ВСМА CART приведены на фиг. 1. Результаты на фиг. 1 показывают, что эффективность экспрессии CAR в клетках ВСМА CART, полученных в примере 4, составляет более 50%.

Пример 5. Оценка функции Т-клеток, модифицированных ВСМА-специфическим химерным антигенным рецептором.

1) Оценка функции in vitro.

Клетки множественной миеломы MM.1S и клетки миелоидного лейкоза K562 (полученные из ATCC) анализировали проточной цитометрией. Результаты приведены на фиг. 2. Результаты на фиг. 2 показывают, что молекулы ВСМА эффективно экспрессируются в клетках MM.1S, но не экспрессируются в клетках K562.

Опыты по оценке киллинга клеток in vitro проводили с помощью набора для детектирования LDH (Promega). Клетки ВСМА CART, полученные в примере 4, и клетки-мишени (такие как клетки MM.1S или клетки K562), использованные с четырьмя градиентами в соответствии с числовым соотношением (то есть множественностью инфекции), а именно 0,5:1, 1:1, 2:1 и 4:1. Из них клетки-мишени составляли 3×10^4 клеток/лунку, и системы во всех остальных лунках дополняли до 200 мкл средой X-VIVO/средой 1640. 96-луночный планшет инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в термостате. Через 17 ч в лунку с максимальным высвобождением добавляли 20 мкл лизата. При тщательном перемешивании клетки полностью разрушались. 96-луночный планшет инкубировали в CO₂ инкубаторе в течение 2 ч. Через 2 ч отмечали

лунку с максимальным высвобождением. После того, как все клетки-мишени лизировались, 50 мкл супернатанта отбирали из каждой лунки и переносили в 96-луночный планшет с плоским дном, и затем в каждую лунку добавляли 50 мкл раствора субстрата и проявляли в темноте в течение 30 мин. Через 30 мин в лунках наблюдали изменение цвета, где лунки с максимальным высвобождением MM.1S и лунки, содержащая клетки ВСМА CART, имели относительно темные цвета. Измерения проводили с помощью ридера для ферментов при длине волны 490 нм. Результаты определения способности к киллингу получали с использованием набора для определения LDH.

Результаты приведены на фиг. 3, киллинговый эффект для клеток K562 показан на фиг. 3А; и киллинговый эффект для клеток MM.1S показан на фиг. 3В. Результаты на фиг. 3 показывают, что ВСМА-специфические CART-клетки, полученные в примере 4, могут специфически индуцировать гибель ВСМА-положительных клеток с высокой киллинговой активностью, например, выше 40%. В то же время эти ВСМА-специфические CART-клетки не оказывают киллингового эффекта на ВСМА-отрицательных клетках.

Опухолевые клетки MM.1S и клетки ВСМА CART, полученные в примере 4, совместно инкубировали и детектировали методом ELISA на содержание IFN- γ и TNF α в супернатанте. Результаты приведены на фиг. 4, где содержание IFN- γ показано на фиг. 4А, и содержание TNF α показано на фиг. 4В. Результаты на фиг. 4 показывают, что различная множественность инфекции может повышать уровни экспрессии цитокинов IFN- γ и TNF α , оказывая киллинговый эффект на опухоли. Это доказывает специфический характер киллингового эффекта ВСМА CART-клеток с другой точки зрения.

2) Эксперименты на животных.

Клетки линии множественной миеломы человека MM.1S трансфектировали для экспрессии репортерного гена люциферазы с получением MM.1S-luc. Среду 1640, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), обычно инкубировали в атмосфере 5% CO₂ в термостате при 37°C. Клетки линии MM.1S-luc вводили из расчета $1,5 \times 10^6$ клеток/200 мкл PBS в хвостовую вену мышей (50 мышей, половина самцов и половина самок) в течение 17 суток. Затем всех животных визуализировали. Мыши, однородно несущие опухоли, входили в опытную группу и их произвольно разделяли на 5 групп (половина самцов и половина самок, по 8 мышей в каждой группе), то есть группу с внеклеточной жидкостью, контрольную группу Т, а также группы с ВСМА CART в низкой, средней и высокой дозе. Из них, группе с внеклеточной жидкости вводили внеклеточную жидкость в хвостовую вену, контрольной группе Т вводили контрольные Т-клетки в хвостовую вену, и группе с ВСМА CART в низкой, средней и высокой дозе вводили в хвостовую вену клетки ВСМА CART, полученные в примере 4.

Через 3 суток мышей анестезировали и внутрибрюшинно вводили субстрат люциферазы. Опухолевую нагрузку в контрольных группах (группа с внеклеточной жидкостью и контрольная группа Т) и группах обработки ВСМА CART определяли с помощью системы визуализации для мелких животных *in vivo*. Результаты на сутки 3 и 7 после лечения показаны на фиг. 5 и 6 соответственно.

Результаты на фиг. 5 показывают, что при визуализации опухолевые клетки практически отсутствуют в группах обработки ВСМА CART в высокой и средней дозах, в то время как опухолевая нагрузка в контрольных группах высокая, тем самым указывая, что ВСМА CART может эффективно элиминировать ВСМА-положительные опухолевые клетки. После того, как клетки ВСМА CART вводили обратно в вену, то интенсивность сигнала флуоресценции у мышей на сутки 3 начала снижаться по сравнению с группой с внеклеточной жидкостью и контрольной группой Т, указывая на то, что опухолевая нагрузка снижалась. По данным фиг. 6 следует, что интенсивность сигнала флуоресценции у мышей на сутки 7 практически не определялась. Можно видеть, что ВСМА CART также демонстрирует сильный терапевтический эффект на заболевания, связанные с экспрессией ВСМА в эксперименте на животных *in vivo*.

Специалисты в данной области техники должны понимать, что, несмотря на то, что здесь было показано и подробно описано много примерных вариантов осуществления настоящей заявки, тем не менее, многие другие вариации или модификации в соответствии с принципами настоящей заявки можно непосредственно определить или получить из раскрытия настоящей заявки, не отступая от сущности или объема настоящей заявки. Таким образом, объем настоящей заявки следует понимать и рассматривать как охватывающий все другие варианты или модификации.

Список последовательностей

<110> SHENZHEN PREGENE BIOPHARMA CO. LTD.

<120> ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР ДЛЯ ВСМА НА ОСНОВЕ ОДНОДОМЕННОГО АНТИТЕЛА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

<130> 0087-PA-003EA

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотная последовательность HCDR1 ВСМА-связывающего домена

<400> 1

Thr Tyr Phe Met Ala

1 5

<210> 2

<211> 18

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотная последовательность HCDR2 ВСМА-связывающего домена

<400> 2

Gly Gly Ile Arg Trp Ser Asp Gly Val Pro His Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 3

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотная последовательность HCDR3 ВСМА-связывающего домена

<400> 3

Cys Ala Ser Arg Gly Ile Ala Asp Gly Ser Asp Phe Gly Ser

1 5 10

<210> 4

<211> 120

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотная последовательность ВСМА-связывающего домена

<400> 4

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

045097

Phe Met Ala Trp Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
 35 40 45

Gly Gly Ile Arg Trp Ser Asp Gly Val Pro His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Ser Arg Gly Ile Ala Asp Gly Ser Asp Phe Gly Ser Tyr Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5

<211> 21

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотная последовательность трансмембранного домена

<400> 5

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr
 20

<210> 6

<211> 49

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотная последовательность шарнирной области

<400> 6

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 20 25 30

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

045097

35

40

45

Asp

<210> 7

<211> 42

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотная последовательность костимулирующего домена

<400> 7

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30

Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40

<210> 8

<211> 114

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотная последовательность внутриклеточного сигнального домена

<400> 8

Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 20 25 30

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 35 40 45

Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 50 55 60

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 65 70 75 80

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 85 90 95

045097

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 100 105 110

Pro Arg

<210> 9
 <211> 21
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> аминокислотная последовательность лидерной последовательности
 <400> 9

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro
 20

<210> 10
 <211> 369
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> аминокислотная последовательность полного CAR (включая лидерную по-
 следовательность)
 <400> 10

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

Ala Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg
 35 40 45

Thr Phe Ser Thr Tyr Phe Met Ala Trp Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Tyr Val Gly Gly Ile Arg Trp Ser Asp Gly Val Pro His
 65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 85 90 95

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110

045097

Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Gly Ile Ala Asp Gly Ser Asp Phe
115 120 125

Gly Ser Tyr Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Pro Ala Lys
130 135 140

Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile
145 150 155 160

Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala
165 170 175

Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr
180 185 190

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
195 200 205

Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile
210 215 220

Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp
225 230 235 240

Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
260 265 270

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
275 280 285

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
290 295 300

Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
305 310 315 320

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
325 330 335

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
340 345 350

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro

355

360

365

Arg

<210> 11

<211> 348

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотная последовательность полного CAR (не включая лидерную последовательность)

<400> 11

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Phe Met Ala Trp Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
 35 40 45

Gly Gly Ile Arg Trp Ser Asp Gly Val Pro His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Ser Arg Gly Ile Ala Asp Gly Ser Asp Phe Gly Ser Tyr Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro
 115 120 125

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 130 135 140

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 145 150 155 160

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 165 170 175

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr

045097

180 185 190

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
195 200 205

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
210 215 220

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
225 230 235 240

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
245 250 255

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
260 265 270

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys
275 280 285

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
290 295 300

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
305 310 315 320

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
325 330 335

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
340 345

<210> 12

<211> 1110

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR (включая лидерную последовательность)

<400> 12

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccggaagtcc aactccaggc ttccggtggc ggtctggcac agcctggagg gtccctgcgg 120

ctctcctgcg cagcaagtgg caggactttc agtacctact ttatggcctg gttcagacag 180

ccacctggca aaggcctcga atacgtcgga gggattagggt ggtctgacgg tgtccctcac 240

tacgctgaca gtgtgaaggg tcggttcacc attagcagag acaacgctaa gaatacagtg 300

045097

tacctgcaaa tgaactcact gagagctgag gatactgctg tgtacttctg cgcactctcg 360
 ggaatcgctg acgggtcaga ctttggctcc tatggacagg gcacccaggt gactgtgagt 420
 tccccagcga agcccaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc 480
 gcgtcgcagc ccctgtccct gcgcccagag gcgtgccggc cagcggcggg gggcgcagtg 540
 cacacgaggg ggctggactt cgctgtgat atctacatct gggcgccctt ggccgggact 600
 tgtgggggtcc ttctcctgtc actgggtatc accctttact gcaaacgggg cagaaagaaa 660
 ctctgtata tattcaaaca accatztatg agaccagtac aaactactca agaggaagat 720
 ggctgtagct gccgatttcc agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagtcc 780
 agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag cagggccaga accagctcta taacgagctc 840
 aatctaggac gaagagagga gtacgatggt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag 900
 atggggggaa agccgcagag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag 960
 aaagataaga tggcggaggg ctacagtgag attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc 1020
 aaggggcacg atggccttta ccagggcttc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc 1080
 cttcacatgc aggccctgcc ccctcgctaa 1110

<210> 13

<211> 1047

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR (не включая лидерную последовательность)

<400> 13

gaagtccaac tccaggcttc cgggtggcggg ctggcacagc ctggaggggc cctgcggctc 60
 tcctgcgcag caagtggcag gactttcagt acctacttta tggcctgggt cagacagcca 120
 cctggcaaag gcctcgaata cgtcggaggg attaggtggt ctgacgggtg ccctcactac 180
 gctgacagtg tgaagggtcg gttcaccatt agcagagaca acgctaagaa tacagtgtac 240
 ctgcaaatga actcactgag agctgaggat actgctgtgt acttctgcgc atctcgcgga 300
 atcgctgacg ggtcagactt tggctcctat ggacagggca cccaggtgac tgtgagttcc 360
 ccagcgaagc ccaccacgac gccagcgcgg cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg 420
 tcgcagcccc tgtccctgcg cccagagggc tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac 480
 acgagggggc tggacttcgc ctgtgatata tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt 540
 ggggtccttc tcctgtcact gggttatcacc ctttactgca aacggggcag aaagaaactc 600
 ctgtatatat tcaaacaacc atttatgaga ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc 660
 tgtagctgcc gatttccaga agaagaagaa ggaggatgtg aactgagagt gaagttcagc 720

045097

aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 780
ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 840
gggggaaagc cgagagaaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa 900
gataagatgg cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag 960
gggcacgatg gcctttacca ggggtctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt 1020
cacatgcagg ccctgcccc tcgctaa 1047

<210> 14
<211> 553
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> последовательность нуклеиновой кислоты промотора EF1
<400> 14
aaggatctgc gatcgctccg gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc ccacagtccc 60
cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aacgggtgcc tagagaaggt ggcgcggggg 120
aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt cccgagggtg ggggagaacc 180
gtatataagt gcagtagtgc ccgtgaacgt tctttttcgc aacgggtttg ccgccagaac 240
acagctgaag cttcgagggg ctcgcatctc tccttcacgc gcccgcgcc ctacctgagg 300
ccgccatcca cgccggttga gtcgcgttct gccgcctccc gcctgtggtg cctcctgaac 360
tgcgctccgc gtctaggtaa gtttaaagct caggctgaga ccgggccttt gtccggcgct 420
cccttgagc ctacctagac tcagccggct ctccacgctt tgccctgacc tgcttgctca 480
actctacgtc tttgtttcgt tttctgttct gcgcggttac agatccaagc tgtgaccggc 540
gcctacgcta gac 553

<210> 15
<211> 423
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> последовательность нуклеиновой кислоты BCMA sdAb I
<400> 15
atggccttac sagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgcgccagc 60
ccggaagtcc aactccaggc ttccgggtggc ggtctggcac agcctggagg gtccctgcgg 120
ctctcctgcg cagcaagtgg caggactttc agtaoctact ttatggcctg gttcagacag 180
ccacctggca aaggcctcga atacgtcgga gggattaggt ggtctgacgg tgtccctcac 240
tacgctgaca gtgtgaaggg tcggttcacc attagcagag acaacgctaa gaatacagtg 300
tacctgcaaa tgaactcact gagagctgag gatactgctg tgtacttctg cgcactctcg 360

TRIM и ZAP70.

8. CAR по любому из пп.1-7, где указанный костимулирующий домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее функциональный вариант.

9. CAR по любому из пп.1-8, где указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3 ζ .

10. CAR по любому из пп.1-9, где указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или ее функциональный вариант.

11. CAR по любому из пп.1-10, дополнительно содержащий лидерную последовательность, где указанная лидерная последовательность содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее функциональный вариант.

12. CAR по любому из пп.1-11, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10-11, или ее функциональный вариант.

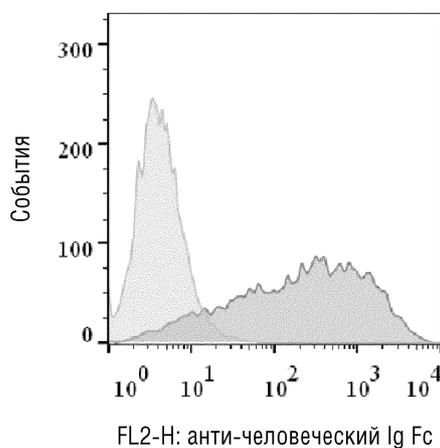
13. Иммунная эффекторная клетка, содержащая указанный CAR по любому из пп.1-12.

14. Иммунная эффекторная клетка по п.13, которая выбрана из Т-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров (NK).

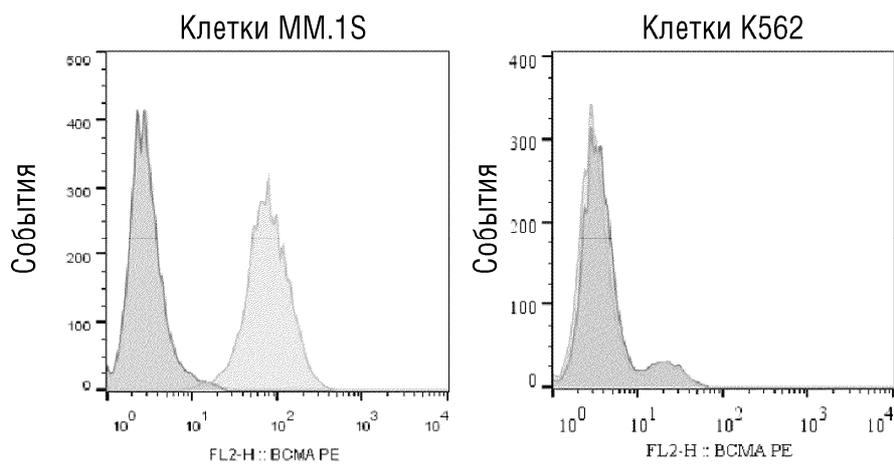
15. Способ лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией ВСМА, включающий введение CAR по любому из пп.1-12 или иммунной эффекторной клетки по любому из пп.13, 14.

16. Способ по п.15, где указанное заболевание или нарушение, связанное с экспрессией ВСМА, представляет собой рак или злокачественную опухоль.

17. Способ по любому из пп.15, 16, где указанное заболевание или нарушение, связанное с экспрессией ВСМА, выбрано из группы, состоящей из В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, бластноклеточной плазмацитоидной дендритно-клеточной цитомы, лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественного лимфопролиферативного состояния, MALT-лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии и миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, плазмоцитоидной дендритно-клеточной цитомы, макроглобулинемии Вальденстрема, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака легких, миеломы, MGUS, плазмоцитомы, системного амилоидоза, вызванного аномальными легкими цепями, образующими амилоидные отложения, и синдрома POEMS.

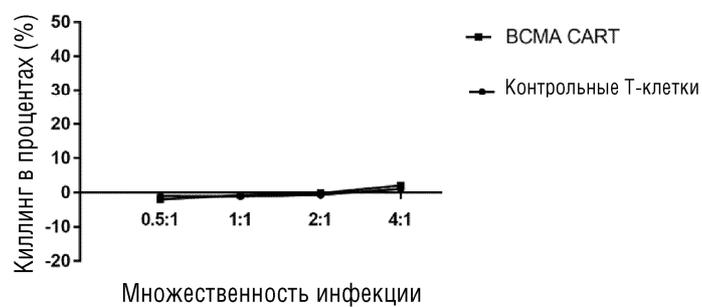


Фиг. 1

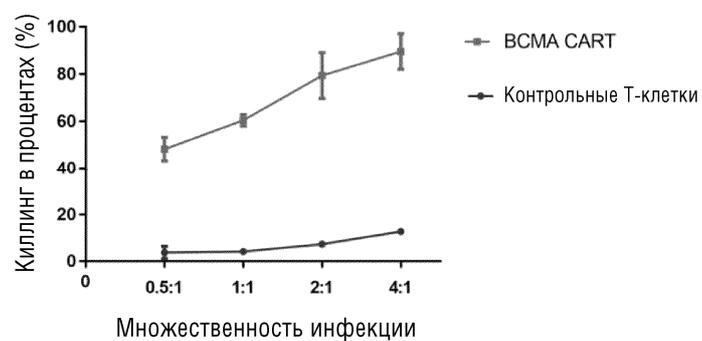


Фиг. 2

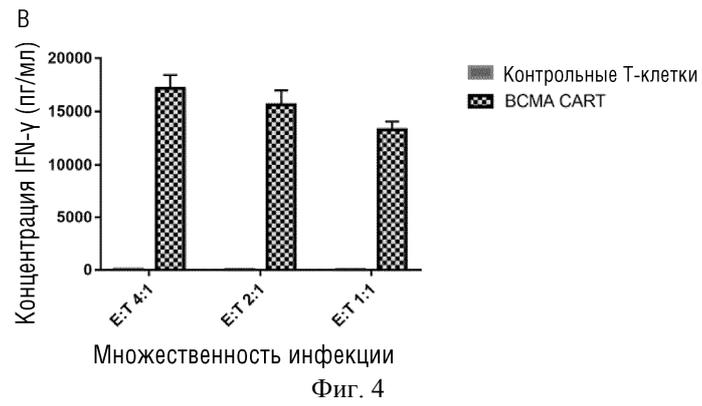
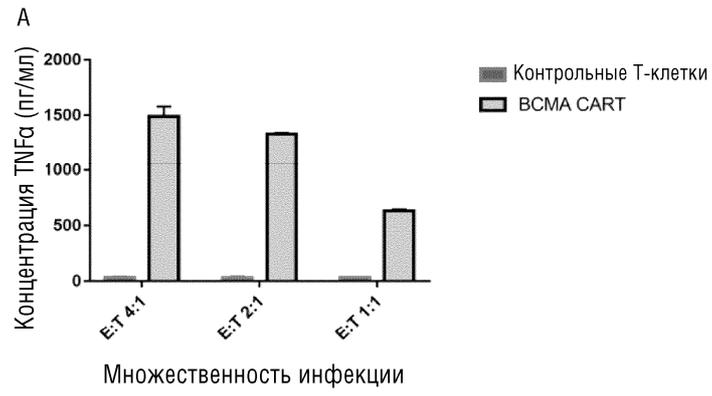
А. Киллинговые эффекты VCMA CART на клетках K562



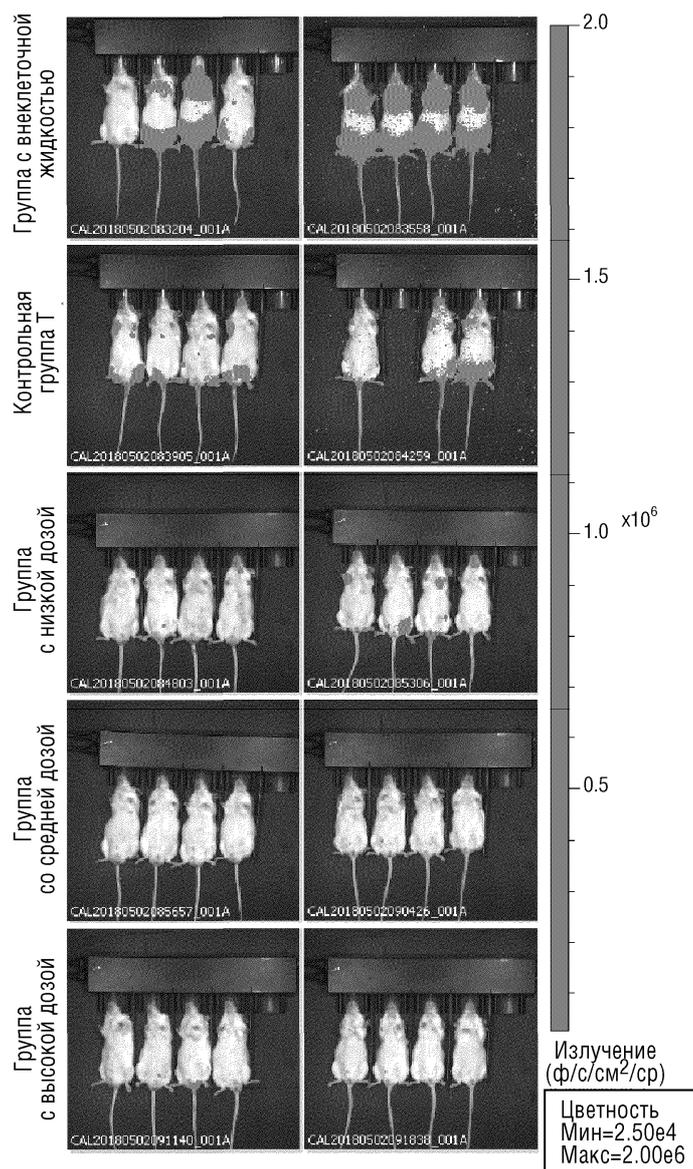
В. Киллинговый эффект VCMA CART на клетках MM.1S



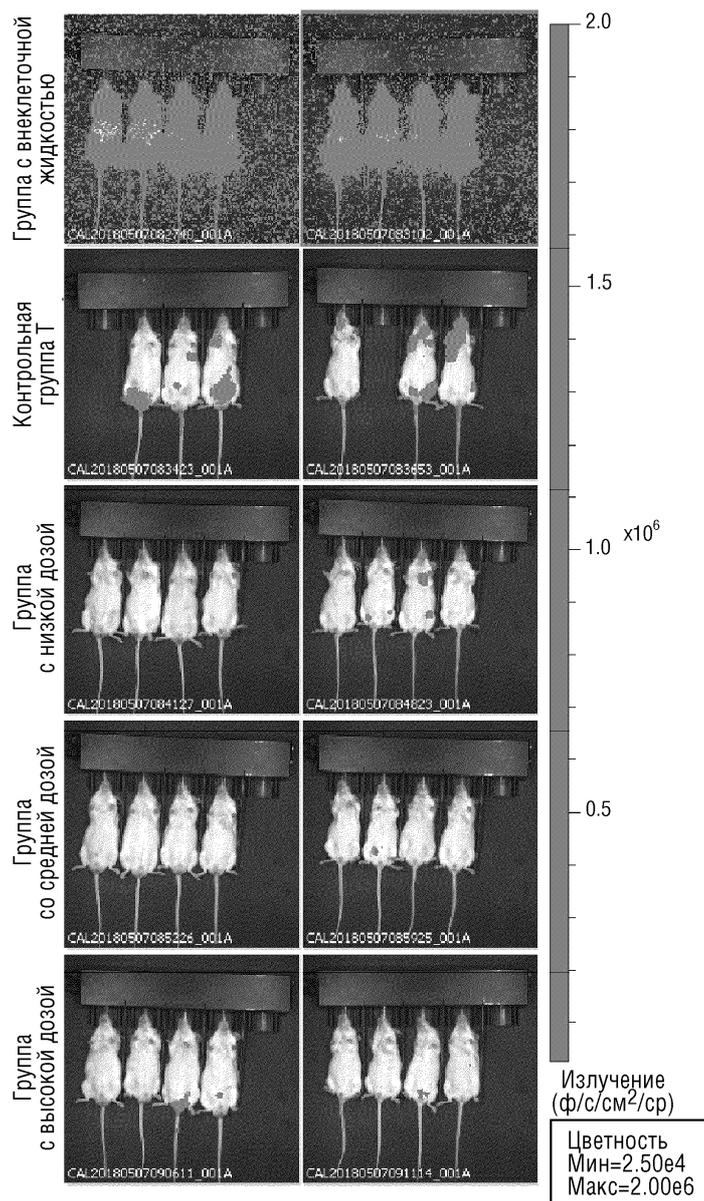
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

