

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045217**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.11.03**

**(21)** Номер заявки  
**202190315**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.07.18**

**(51)** Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 35/17* (2015.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)  
*C07K 14/725* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

---

**(54) ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ СО СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К ВСМА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 62/700,615

**(32)** 2018.07.19

**(33)** US

**(43)** 2021.04.16

**(86)** PCT/US2019/042452

**(87)** WO 2020/018825 2020.01.23

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Дайлилло Дэвид, Дельфино Фрэнк,  
Брей Кевин, Мигер Томас Крейг,  
Кишнер Джессика, Синешчекова  
Ольга (US)**

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

**(56)** SMITH E.L. et al.: "Development and evaluation of an optimal human single-chain variable fragment-derived BCMA-targeted CAR T cell vector", MOL. THER., vol. 26, № 6, 6 June 2018 (2018-06-06), p. 1447-1456, XP002795010, the whole document  
HARRINGTON K. et al.: "Development of JCARH125: Optimization of a Fully Human Anti-Bcma CAR for Use in the Treatment of Multiple Myeloma", BLOOD, vol. 130, № S1, 7 December 2017 (2017-12-07), p. 1813, XP002795011, the whole document

WO-A1-2019149249

---

**(57)** Антиген созревания В-клеток (BCMA) экспрессируется на злокачественных плазматических клетках. В изобретении предлагаются BCMA-специфические химерные антигенные рецепторы и клетки, экспрессирующие такие химерные антигенные рецепторы. В определенных вариантах осуществления изобретения сконструированные клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы по изобретению, способны ингибировать рост опухолей, экспрессирующих BCMA. Сконструированные клетки по изобретению являются пригодными для лечения заболеваний и нарушений, при которых желателен и/или терапевтически полезен усиленный или индуцированный иммунный ответ, нацеленный на BCMA. Например, сконструированные клетки, экспрессирующие BCMA-специфические химерные антигенные рецепторы по изобретению, пригодны для лечения различных видов рака, включая множественную миелому.

---

**045217 B1**

**045217 B1**

### Ссылка на перечень последовательностей

В данную заявку посредством ссылки включен перечень последовательностей, представленный в машиночитаемой форме в виде файла 10455WO01-Sequence.txt, созданного 17 июля 2019 г. и имеющего размер 66.907 байт.

### Область техники

Данное изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR) и сконструированным клеткам, содержащим такие CAR, которые специфичны для антигена созревания В-клеток (BCMA), и способам их применения.

### Уровень техники

Антиген созревания В-клеток (BCMA), также известный как TNFRSF17 или CD269, представляет собой трансмембранный белок типа III, лишенный сигнального пептида и содержащий внеклеточный домен, богатый цистеином. BCMA, наряду с близкородственными белками, способствует выживанию В-клеток на различных стадиях развития. BCMA экспрессируется исключительно в клетках линии В-клеток, особенно в межфолликулярной области зародышевого центра, а также на плазмобластах и дифференцированных плазматических клетках. BCMA избирательно индуцируется во время дифференцировки плазматических клеток и необходим для оптимального выживания долгоживущих плазматических клеток в костном мозге. При множественной миеломе BCMA широко экспрессируется на злокачественных плазматических клетках в повышенных уровнях, при этом экспрессия BCMA повышается по мере прогрессирования от нормальных клеток к активной множественной миеломе. BCMA также экспрессируется при других В-клеточных злокачественных новообразованиях, включая макроглобулинемию Вальденстрема, лимфому Беркитта и диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (Tai et al., *Immunotherapy*, 7(11):1187-1199, 2015).

Адоптивная иммунотерапия, которая включает перенос аутологичных антигенспецифических Т-клеток, генерированных *ex vivo*, является многообещающей стратегией лечения вирусных инфекций и рака. Т-клетки, применяемые для адоптивной иммунотерапии, могут быть получены либо путем размножения антигенспецифических Т-клеток, либо перенаправления Т-клеток с помощью генной инженерии. Новые специфические характеристики Т-клеток были успешно сгенерированы посредством генетического переноса рецепторов трансгенных Т-клеток или химерных антигенных рецепторов (CAR) (Jena, Dotti et al., 2010). CAR представляют собой синтетические рецепторы, состоящие из нацеливающего фрагмента, который связан с одним или большим количеством сигнальных доменов в одной слитой молекуле. Как правило, связывающий фрагмент CAR состоит из антигенсвязывающего домена одноцепочечного антитела (scFv), содержащего переменные фрагменты легкой и тяжелой цепи моноклонального антитела, соединенные гибким линкером. Сигнальные домены для CAR первого поколения происходят из цитоплазматической области CD3зета или гамма-цепей рецептора Fc. Было продемонстрировано, что CAR первого поколения успешно перенаправляют цитотоксичность Т-клеток. Однако они не смогли обеспечить длительное размножение и противоопухолевую активность *in vivo*. Сигнальные домены из костимулирующих молекул, а также трансмембранные и шарнирные домены были добавлены для образования CAR второго и третьего поколений, что привело к некоторым успешным терапевтическим исследованиям с участием людей. Например, CAR-перенаправленные Т-клетки, специфичные для дифференцировочного антигена В-клеток CD19, продемонстрировали огромную эффективность при лечении злокачественных новообразований В-клеток, в то время как TCR-перенаправленные Т-клетки продемонстрировали преимущества у пациентов, страдающих солидным раком. Stauss et al. описывают стратегии модификации терапевтических CAR и TCR для применения при лечении рака, например, для усиления антигенспецифической эффекторной функции и ограничения токсичности сконструированных Т-клеток (*Current Opinion in Pharmacology*, 2015, 24:113-118).

Сконструированные клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы, нацеленные на BCMA, могут быть полезны в клинических ситуациях, в которых желательно специфическое нацеливание и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих BCMA.

### Краткое описание сущности изобретения

В одном аспекте данного изобретения предлагается химерный антигенный рецептор, специфичный к антигену созревания В-клеток (BCMA), содержащий от N-конца до C-конца

- (a) внеклеточный лигандсвязывающий домен, содержащий антигенсвязывающий домен анти-BCMA;
- (b) шарнир;
- (c) трансмембранный домен; и
- (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен и сигнальный домен.

В некоторых случаях внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит домен одноцепочечного (scFv) переменного фрагмента анти-BCMA, содержащий переменную область легкой цепи (LCVR) и переменную область тяжелой цепи (HCVR). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения домен scFv анти-BCMA содержит линкер между LCVR и HCVR. В некоторых случаях химерный антигенный рецептор дополнительно содержит линкер между внеклеточным лигандсвязывающим доменом (например, доменом scFv) и шарниром. В некоторых случаях указанный линкер содержит аминокислоты

кислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 93-96. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный линкер представляет собой линкер (G4S)<sub>n</sub>, где n равно 1-10.

В некоторых случаях шарнир, трансмембранный домен или и то, и другое происходят из полипептида CD8a. В некоторых случаях костимулирующий домен содержит костимулирующий домен 4-1BB. В некоторых случаях сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3дзета. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнир содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения костимулирующий домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сигнальный домен CD3дзета содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100.

В некоторых случаях LCVR содержит определяющие комплементарности области (CDR) LCVR, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58 и 74. В некоторых случаях LCVR содержит домены LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12-14-16, 28-30-32, 44-46-48, 60-62-64 или 76-78-80 соответственно. В некоторых случаях HCVR включает CDR HCVR, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50 и 66. В некоторых случаях HCVR содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4-6-8, 20-22-24, 36-38-40, 52-54-56 или 68-70-72 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58 и 74, или аминокислотную последовательность, имеющую 95-99% идентичности последовательности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58 и 74; и HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50 и 66, или аминокислотную последовательность, имеющую 95-99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50 и 66. В некоторых случаях LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58 и 74, а HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50 и 66.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей LCVR/HCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10/2, 26/18, 42/34, 58/50 или 74/66. В некоторых случаях LCVR и HCVR соединены линкером, необязательно линкером (G4S)<sub>n</sub>, в котором n=1-3.

В некоторых случаях химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

В другом аспекте данного изобретения предлагается выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор, как обсуждалось выше или описано в данном документе. В некоторых случаях молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81, 83, 85, 87 и 89.

В другом аспекте данного изобретения предлагается вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, как обсуждалось выше или описано в данном документе. В некоторых случаях указанный вектор представляет собой ДНК-вектор, РНК-вектор, плазмиду, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

В другом аспекте данного изобретения предлагается клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, как обсуждалось выше или описано в данном документе. В некоторых случаях клетка представляет собой Т-клетку человека.

В другом аспекте данного изобретения предлагается сконструированная клетка, содержащая химерный антигенный рецептор, как обсуждалось выше или описано в данном документе. В некоторых случаях указанная сконструированная клетка является иммунной клеткой. В некоторых случаях указанная иммунная клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых случаях указанная эффекторная иммунная клетка представляет собой Т-лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный Т-лимфоцит представляет собой воспалительный Т-лимфоцит, цитотоксиче-

ский Т-лимфоцит, регуляторный Т-лимфоцит или Т-лимфоцит-хелпер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная клетка представляет собой цитотоксический CD8+ Т-лимфоцит.

В некоторых случаях сконструированные клетки по данному изобретению применяются для лечения рака, экспрессирующего ВСМА. В некоторых случаях рак, экспрессирующий ВСМА, представляет собой множественную миелому.

В другом аспекте данного изобретения предлагается сконструированная Т-клетку человека, содержащая химерный антигенный рецептор, содержащий от N-конца до С-конца

(а) внеклеточный лигандсвязывающий домен, содержащий домен одноцепочечного варибельного фрагмента анти-ВСМА (scFv), содержащий варибельную область легкой цепи (LCVR) и варибельную область тяжелой цепи (HCVR);

(b) шарнир;

(c) трансмембранный домен; и

(d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3дзета.

В некоторых случаях домен scFv содержит пару аминокислотных последовательностей LCVR/HCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10/2, 26/18, 42/34, 58/50 или 74/66. В некоторых случаях шарнир содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97. В некоторых случаях трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98. В некоторых случаях костимулирующий домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99. В некоторых случаях сигнальный домен CD3дзета содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

В другом аспекте данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая генетически модифицированную Т-клетку человека и фармацевтически приемлемый носитель, при этом генетически модифицированная Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор, как описано выше или описано в данном документе. В некоторых случаях указанная фармацевтическая композиция предназначена для лечения рака, экспрессирующего ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак, экспрессирующий ВСМА, представляет собой множественную миелому.

В другом аспекте данного изобретения предлагается сконструированный элемент, как обсуждалось выше или описано в данном документе. В некоторых случаях указанная фармацевтическая композиция предназначена для лечения рака, экспрессирующего ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак, экспрессирующий ВСМА, представляет собой множественную миелому.

В другом аспекте данного изобретения предлагается применение химерного антигенного рецептора, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора, клетки или сконструированной клетки, обсуждаемые выше или описанные в данном документе, при изготовлении лекарственного средства для лечения рака, экспрессирующего ВСМА. В некоторых случаях рак, экспрессирующий ВСМА, представляет собой множественную миелому. В различных вариантах осуществления данного изобретения химерные антигенные рецепторы, молекулы нуклеиновых кислот, векторы, клетки или сконструированные клетки, обсуждаемые выше или описанные в данном документе, рассматриваются для применения в любом из способов, обсуждаемых выше или описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения обсуждаемые в данном документе антители предназначены для применения в медицинской практике или для лечения злокачественного новообразования, как обсуждалось выше или описано в данном документе.

В другом аспекте данного изобретения предлагается способ усиления активности Т-лимфоцитов у субъекта, включающий введение указанному субъекту Т-лимфоцита, содержащего химерный антигенный рецептор, как обсуждалось выше или описано в данном документе.

В другом аспекте данного изобретения предлагается способ лечения субъекта, страдающего раком, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества Т-лимфоцита, содержащего химерный антигенный рецептор, как обсуждалось выше или описано в данном документе.

В другом аспекте данного изобретения предлагается способ стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа в целевой популяции клеток или ткани у субъекта, включающий введение

указанному субъекту эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии химерного антигенного рецептора, как обсуждалось выше или описано в данном документе.

В другом аспекте данного изобретения предлагается способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у субъекта, при этом указанный способ включает введение субъекту эффективного количества клетки, генетически модифицированной для экспрессии химерного антигенного рецептора, как обсуждалось выше или описано в данном документе

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных выше, субъектом является человек. В некоторых случаях субъект страдает множественной миеломой, острым лимфобластным лейкозом В-клеточной линии, В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом, В-клеточной неходжкинской лимфомой, лейкозом и лимфомой, острым лимфобластным лейкозом, лимфомой Ходжкина или острым лимфобластным лейкозом у детей. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект страдает множественной миеломой.

В другом аспекте данного изобретения предлагается способ конструирования популяции клеток для экспрессии химерного антигенного рецептора, при этом указанный способ включает

- (a) обеспечение популяции иммунных клеток;
- (b) введение в иммунные клетки молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор, как обсуждалось выше или описано в данном документе;
- (c) культивирование иммунных клеток в условиях экспрессии молекул нуклеиновой кислоты; и
- (d) выделение иммунных клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор на поверхности клеток.

В некоторых случаях указанный способ дополнительно включает получение популяции иммунных клеток от субъекта до введения молекулы нуклеиновой кислоты.

В другом аспекте данного изобретения предлагается способ лечения рака, экспрессирующего ВСМА, у субъекта, при этом указанный способ включает

- (a) конструирование популяции клеток согласно способу, описанному выше; и
- (b) повторное введение субъекту популяции иммунных клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак, экспрессирующий ВСМА, представляет собой множественную миелому.

Другие варианты осуществления данного изобретения станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

#### **Краткое описание графических материалов**

На чертеже продемонстрирована типовая нуклеотидная конструкция для экспрессии конструкции химерного антигенного рецептора (CAR). Типовая нуклеотидная конструкция содержит анти-ВСМА VL-линкер-VH scFv, CD8 шарнирный и трансмембранный домен человека, костимулирующий домен 4-1BB, сигнальный домен CD3зета и последовательность IRES: eGFP для отслеживания CAR-трансдуцированных клеток.

#### **Подробное описание сущности изобретения**

Перед прочтением описания данного изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что применяемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты осуществления или признаки вариантов осуществления могут быть объединены друг с другом, и такие комбинации явно входят в объем данного изобретения. Любое конкретное значение, обсуждаемое выше или описанное в данном документе, может быть объединено с другим связанным значением, обсуждаемым выше или описанным в данном документе, чтобы указать диапазон со значениями, представляющими верхний и нижний пределы диапазона, и такие диапазоны входят в объем данного описания.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится данное изобретение. Применяемый в данном документе термин "около" при использовании его в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, в данном контексте выражение "около 100" включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, можно применять при практическом осуществлении или испытании данного изобретения, далее будут описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в этом описании, полностью включены в данное описание посредством ссылки.

Определения.

Выражение "ВСМА" в контексте данного описания относится к антигену созревания В-клеток. ВСМА (также известный как TNFRSF17 и CD269) представляет собой белок клеточной поверхности,

экспрессируемый на злокачественных плазматических клетках, и играет центральную роль в регулировании созревания и дифференцировки В-клеток в плазматические клетки, продуцирующие иммуноглобулин. В данном контексте термин "BCMA" относится к белку BCMA человека, если не указано, что он происходит из нечеловеческого вида (например, "BCMA мыши", "BCMA обезьяны" и т.д.). Белок BCMA человека имеет аминокислотную последовательность, продемонстрированную в SEQ ID NO: 101.

В данном контексте термин "антитело, связывающее BCMA" или "антитело анти-BCMA" включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают BCMA.

Термины "лигандсвязывающий домен" и "антигенсвязывающий домен" применяются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к той части химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела, которая специфически связывается с заранее определенным антигеном (например, BCMA). Ссылки на "соответствующее антитело" относятся к антителу, от которого происходят CDR или вариабельные области (HCVR и LCVR), применяемые в химерном антигенном рецепторе. Например, конструкции химерного антигенного рецептора, обсуждаемые в примере 2, включают scFv с вариабельными областями, полученными из специфических антител анти-BCMA. Эти антитела анти-BCMA представляют собой "соответствующие антитела" к соответствующим химерным антигенным рецепторам.

В данном контексте термин "антитело" означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, BCMA). В данном контексте термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные 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, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или  $V_H$ ) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ . Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или  $V_L$ ) 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 данного изобретения FR антитела анти-BCMA (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или большего количества CDR.

В данном контексте термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полного антитела. Термины "антигенсвязывающая часть антитела", "антигенсвязывающий фрагмент антитела" и тому подобное, применяемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела с применением любых пригодных стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной ДНК и генной инженерии, включающие обработку и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна из, например, коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаговых антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с применением методик молекулярной биологии, например, для упорядочивания одного или большего количества вариабельных и/или константных доменов в пригодную конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают

- (i) Fab фрагменты;
- (ii)  $F(ab')_2$  фрагменты;
- (iii) Fd фрагменты;
- (iv) Fv фрагменты;
- (v) одноцепочечные молекулы Fv(scFv);
- (vi) dAb фрагменты; и

(vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид 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, двухвалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", применяемое в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, может содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом или в рамке считывания с одной или большим количеством каркасных последовательностей. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен  $V_H$ , связанный с доменом  $V_L$ , домены  $V_H$  и  $V_L$  могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем взаиморасположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры  $V_H$ - $V_H$ ,  $V_H$ - $V_L$  или  $V_L$ - $V_L$ . В альтернативном варианте антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен  $V_H$  или  $V_L$ .

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие типовые 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 типовых конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или большего количества) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по данному изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или большим количеством мономерных доменов  $V_H$  или  $V_L$  (например, посредством дисульфидной (дисульфидных) связи (связей)).

В определенных вариантах осуществления данного изобретения антитела анти-BCMA представляют собой антитела человека. В данном контексте термин "антитело человека" предполагает включение в себя антител, имеющих переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека согласно данному изобретению могут содержать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако в данном контексте термин "антитело человека" не предполагает включение антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

Указанные антитела в некоторых вариантах осуществления данного изобретения представляют собой рекомбинантные антитела человека. В данном контексте термин "рекомбинантное антитело человека" предназначен для включения всех антител человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, например, антител, экспрессируемых с применением рекомбинантного экспрессионного вектора, 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 для генов иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al., 1992, Nucl. Acids Res., 20:6287-6295), или антител, полученных, экспрессируемых, созданных или выделенных любым другим способом, который включает в себя сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и

константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, при использовании животных, трансгенных по последовательностям Ig человека, соматический мутагенез *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей  $V_H$  и  $V_L$  рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей  $V_H$  и  $V_L$  зародышевой линии человека и связаны с ними, в естественных условиях не могут существовать в репертуаре зародышевой линии антитела человека *in vivo*.

Антитела человека могут существовать в двух формах, которые ассоциированы с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию с массой приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе посредством дисульфидной связи тяжелой цепи. Во второй форме димеры не связаны через межцепочечные дисульфидные связи, и образуется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (полуантитело). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных интактных изоформах IgG обусловлена, но не ограничивается, структурными различиями, ассоциированными с изоформой шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области шарнира IgG4 человека может значительно уменьшить проявление второй формы (Angal et al., 1993, *Molecular Immunology*, 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых с применением шарнира IgG1 человека. Данное изобретение охватывает антитела, имеющие одну или большее количество мутаций в шарнире,  $C_H2$  или  $C_H3$  области, которые могут быть желательны, например, при изготовлении, для улучшения выхода желаемой формы антитела.

Указанные антитела могут быть выделенными антителами. В данном контексте термин "выделенное антитело" 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 извлечено 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 изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одного этапа очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления данного изобретения, выделенное антитело может быть по существу не содержащим другого клеточного материала и/или химических веществ.

Антитела анти-BCMA, описанные в данном документе, могут содержать одну или большее количество аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях переменных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения описанных в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Данное изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе, в которых одна или большее количество аминокислот в одной или большем количестве каркасных и/или CDR-областях мутированы в соответствующий(ие) остаток(и) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий(ие) остаток(и) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе совместно как "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области техники, начиная с описанных в данном документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко продуцировать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или большее количество индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения все каркасные и/или CDR-остатки в доменах  $V_H$  и/или  $V_L$  мутируют обратно в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления данного изобретения только определенные остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество каркасных и/или CDR остатков мутируют в соответствующий(ие) остаток(и) последовательности другой зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело было первоначально получено). Кроме того, антитела по данному изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркаса и/или областей CDR, например, в которых определенные отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируют в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения, антитела и анти-



генсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или большее количество мутаций зародышевой линии, можно легко проверить на одно или большее количество желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), снижена иммуногенность и др. Указанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, включены в данное изобретение.

Антитела анти-BCMA могут включать варианты любой из описанных в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или большее количество консервативных замен. Например, антитела анти-BCMA могут иметь аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативных аминокислотных замен относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом, в вариабельной области молекулы антитела, известной 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 эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", при обозначении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента, указывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) присутствует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере в около 95% и более предпочтительно по меньшей мере в около 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, измеренная с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, в некоторых случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу сходную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу сходный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с применением значений гепов по умолчанию имеют идентичность последовательности по меньшей мере 95% и даже больше, предпочтительно по меньшей мере 95, 98 или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Консервативная аминокислотная замена представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). Как правило, консервативная аминокислотная замена не будет по существу изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или большее количество аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень сходства могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы исправить консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, публикацию Pearson, 1994, *Methods Mol. Biol.*, 24:307-331, включенную в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают в себя

- (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин;
- (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серии 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 альтернативном варианте консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в логарифмической матрице правдоподобия PAM250, описанной в публикации Gonnet et al., 1992, *Science*, 256:1443-1445, включенной в данный документ посредством ссылки. Умеренно консервативной заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в логарифмической матрице правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью после-

довательностей, обычно измеряют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет сходные последовательности, используя показатели сходства, назначенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут быть применены с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между родственными 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, применяя FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательности областей наилучшего перекрытия между запросом и последовательностями поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по данному изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, публикации Altschul et al. (1990), *J. Mol. Biol.*, 215:403-410; Altschul et al. (1997), *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402, каждая из которых включена в данное описание посредством ссылки.

В данном контексте 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 фрагментам, полученным в результате лигирования, расщепления, действия эндонуклеаз или действия экзонуклеаз. Молекулы нуклеиновых кислот могут состоять из мономеров, которые являются встречающимися в природе нуклеотидами (такими как ДНК и РНК), или аналогами встречающихся в природе нуклеотидов (например, энантиомерные формы встречающихся в природе 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 большего количества 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 в фрагменте основания включают алкилированные пурины и пиримидины, ацилированные пурины или пиримидины или другие хорошо известные гетероциклические заместители. Мономеры нуклеиновых кислот могут быть связаны фосфодифирными связями или аналогами таких связей. Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными.

Термин "химерный антигенный рецептор" (CAR) относится к молекулам, которые объединяют связывающий домен с компонентом, присутствующим на клетке-мишени, например, специфичность на основе антител к желаемому антигену (например, опухолевому антигену, такому как ВСМА) с внутриклеточным доменом, активирующим Т-клеточный рецептор, для образования химерного белка, который проявляет специфическую антицелевую клеточную иммунную активность. Как правило, CAR состоят из внеклеточного одноцепочечного антителосвязывающего домена (scFv), слитого с внутриклеточным сигнальным доменом дзета-цепи Т-клеточного антигенного рецепторного комплекса, и обладают способностью, при экспрессии в Т-клетках, перенаправлять распознавание антигена на основе специфичности моноклонального антитела.

В данном контексте термин "вектор" включает, помимо прочего, вирусный вектор, плазмиду, вектор РНК или линейную или кольцевую молекулу ДНК или РНК, которая может состоять из хромосомных, нехромосомных, полусинтетических или синтетических нуклеиновых кислот. В некоторых случаях, эти векторы способны к автономной репликации (эписомальный вектор) и/или экспрессии нуклеиновых кислот, с которыми они связаны (векторы экспрессии). Большое количество пригодных векторов известно специалистам в данной области техники и коммерчески доступно. Вирусные векторы включают ретровирус, аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированные вирусы), коронавирусы, вирусы с отрицательной цепью РНК, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, вирус кори и Сендай), вирусы с положительной цепью РНК, такие как пикорнавирус и альфавирус, и двухцепочечные ДНК-вирусы, включая аденовирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) и поксвирус (например, вирус осповакцины, оспы птиц и канареек). Другие вирусы включают, например, вирус Норуолк, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примеры ретровирусов включают вирус лейкоза-саркомы птиц, вирусы С-типа, В-типа млекопитающих, вирусы D-типа, группу вирусов HTLV-BLV, а также лентивирус.

"Костимулирующий домен" или "костимулирующая молекула" относится к родственному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ клетки, такой как, помимо прочего, пролиферация. Костимулирующие молекулы включают, помимо прочего, молекулу МНС класса I, BTLA и рецептор Toll лиганда.

Примеры костимулирующих молекул включают CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137) (SEQ ID NO: 99), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (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, отличающуюся от рецептора антигена или его лигандов, которая необходима для эффективного иммунного ответа.

"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), межклеточную молекулу адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, рецептор лимфотоксина бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, агонист или антитело, связывающее рецептор Toll лиганда, и лиганд, который специфически связывается с B7-H3.

"Костимулирующий сигнал" относится к сигналу, который в сочетании с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к пролиферации Т-клеток и/или к повышению или понижению экспрессии ключевых молекул.

В данном контексте термин "внеклеточный лигандсвязывающий домен" относится к олиго-или полипептиду, который способен связывать лиганд, например, молекулу клеточной поверхности. Например, внеклеточный лигандсвязывающий домен может быть выбран для распознавания лиганда, который действует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, ассоциированных с конкретным патологическим состоянием (например, раком). Примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут действовать как лиганды, включают маркеры, ассоциированные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунными заболеваниями и раковыми клетками.

В данном контексте термин "субъект" или "пациент" включает всех представителей животного мира, включая приматов примат, не относящихся к человеку, а также людей. В одном варианте осуществления данного изобретения пациенты являются людьми с раком (например, множественной миеломой).

В данном контексте термин "домен трансдукции сигнал" или "сигнальный домен" CAR отвечает за внутриклеточный сигналинг после связывания внеклеточного лигандсвязывающего домена с мишенью, что приводит к активации иммунной клетки и иммунному ответу. Другими словами, домен трансдукции сигнала отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которой экспрессируется CAR. Например, эффекторная функция Т-клетки может представлять собой цитолитическую активность или вспомогательную активность, включая секрецию цитокинов. Таким образом, термин "домен трансдукции сигнала" относится к части белка, которая трансдуцирует сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специальной функции. Примерами доменов трансдукции сигнала для применения в CAR могут быть цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора и корецепторов, которые действуют совместно, иницируя передачу сигнала после взаимодействия антигенного рецептора, а также любые производные или варианты этих последовательностей и любую синтетическую последовательность, имеющую 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 костимуляторный сигнал. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как мотивы активации ITAM на основе иммунорецепторного тирозина. ITAM представляют собой четко определенные сигнальные мотивы, обнаруженные в интрацитоплазматическом хвосте множества рецепторов, которые служат сайтами связывания для тирозинкиназ класса syk/zap70. Примеры ITAM включают те, которые происходят из TCRдзета, FcRгамма, FcRбета, FcRэпсилон, CD3гамма, CD3дельта, CD3эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения домен трансдукции сигнала CAR может содержать сигнальный домен CD3дзета (SEQ ID NO: 100).

Химерные антигенные рецепторы (CAR).

Химерные антигенные рецепторы (CAR) перенаправляют специфичность Т-клеток к распознаваемым антителами антигенам, экспрессируемым на поверхности клеток (например, раковых клетках), в то время как рецепторы Т-клеток (TCR) расширяют диапазон мишеней, включая внутриклеточные антигены (например, опухолевые антигены).

Один из аспектов данного изобретения включает химерный антигенный рецептор (CAR), который специфичен для антигена созревания В-клеток (BCMA), экспрессируемого на поверхности злокачественных плазматических клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения CAR, как описано в данном документе, включает внеклеточный специфичный для мишени связывающий домен, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен (такой как сигнальный домен, полученный из CD3дзета или FcRгамма) и/или один или большее количество костимулирующих сигнальных доменов,

происходящих от костимулирующей молекулы, такой как, помимо прочего, 4-1BB. В одном варианте осуществления данного изобретения CAR включает шарнирную или спейсерную область между внеклеточным связывающим доменом и трансмембранным доменом, например шарнир CD8альфа.

Связывающий домен или внеклеточный домен CAR обеспечивает CAR способность связываться с антигеном-мишенью, представляющим интерес. Связывающий домен (например, лигандсвязывающий 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 компонентом). 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 цепи могут быть объединены в одну цепь и в любой ориентации (например, VL-VH или VH-VL). Известны различные анализы для идентификации связывающих доменов по данному изобретению, которые специфически связываются с конкретной мишенью, включая вестерн-блоттинг, ИФА, проточную цитометрию или анализ поверхностного плазмонного резонанса (например, с помощью анализа BIACORE). Мишенью может быть антиген, представляющий клинический интерес, против которого было бы желательно запустить эффекторный иммунный ответ, который приводит к уничтожению опухоли. В одном варианте осуществления данного изобретения антиген-мишень связывающего домена химерного антигенного рецептора представляет собой белок ВСМА на поверхности опухолевых клеток, в частности, опухолевых клеток В-клеточного происхождения, таких как клетки множественной миеломы.

Иллюстративные лигандсвязывающие домены включают антигенсвязывающие белки, такие как антигенсвязывающие фрагменты антитела, такие как scFv, scTCR, внеклеточные домены рецепторов, лиганды для молекул/рецепторов клеточной поверхности или их рецепторсвязывающие домены и опухолевые связывающие белки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения антигенсвязывающие домены, включенные в CAR по данному изобретению, могут представлять собой переменную область (Fv), CDR, Fab, scFv, VH, VL, вариант доменного антитела (dAb), антитело верблюда (VHH), вариант домена фибронектина 3, вариант анкиринового повтора и другой антиген-специфический связывающий домен, полученный из других белковых каркасов.

В одном варианте осуществления данного изобретения связывающий домен CAR представляет собой одноцепочечное антитело анти-ВСМА (scFv) и может представлять собой scFv мыши, человека или быть гуманизированным scFv. Одноцепочечные антитела можно клонировать из генов V-области гибридомы, специфичных для желаемой мишени. Методика, которую можно применять для клонирования переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL), описана, например, в публикации Orlandi et al., PNAS, 1989; 86:3833-3837. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения связывающий домен включает связывающий домен, полученный из антитела, но может быть связывающим доменом, не полученным из антитела. Связывающий домен, полученный из антитела, может представлять собой фрагмент антитела или продукт, полученный с помощью генной инженерии, одного или большего количества фрагментов антитела, причем этот фрагмент участвует в процессе связывания с антигеном.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR по данному изобретению могут содержать линкер между различными доменами, добавленный для соответствующего расположения и конформации молекулы. Например, в одном варианте осуществления данного изобретения может быть линкер между связывающим доменом VH или VL, длина которого может составлять от 1 до 10 аминокислот. В других вариантах осуществления данного изобретения линкер между любым из доменов химерного антигенного рецептора может иметь длину от 1 до 20 или 20 аминокислот. В этом отношении линкер может состоять из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот в длину. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения 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, например, линкер длиной 10-30 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения линкеры, пригодные для применения в описанном в данном документе CAR, являются гибкими линкерами. Пригодные линкеры могут быть легко выбраны, и могут иметь любую подходящую длину, например, от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, в том числе от 4 до 10 аминокислот, от 5 до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот и могут иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот.

Примеры гибких линкеров включают полимеры глицина (G)<sub>n</sub>, полимеры глицин-серина, где n представляет собой целое число по меньшей мере один, полимеры глицин-аланина, полимеры аланин-серина и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Глицин и полимеры глицин-серина относительно неструктурированы и поэтому могут служить нейтральной связью между доменами слитых белков, таких как CAR, описанных в данном документе. Глицин имеет доступ к значительно большему пространству phi-psi, чем даже аланин, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длин-

ными боковыми цепями (см. публикацию Scheraga, Rev. Computational Chem., 11173-142 (1992)). Специалисту в данной области техники будет понятно, что конструкция CAR может включать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может включать гибкий линкер, а также одну или большее количество частей, которые придают менее гибкую структуру для обеспечения желаемой структуры CAR. Конкретные линкеры включают линкеры (G4S)<sub>n</sub>, где n=1-3, как продемонстрировано в SEQ ID NO: 95-97, а также линкер, продемонстрированный в SEQ ID NO: 96.

За связывающим доменом CAR может следовать "спейсер" или "шарнир", который относится к области, которая перемещает антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторной клетки для обеспечения надлежащего межклеточного контакта, связывания антигена и активации. (Patel et al., Gene Therapy, 1999, 6:412-419). Шарнирная область в CAR обычно находится между трансмембранным (ТМ) и связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения шарнирная область представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и может быть шарнирной областью иммуноглобулина дикого типа или измененной шарнирной областью иммуноглобулина дикого типа. Другие типовые шарнирные области, применяемые в CAR, описанных в данном документе, включают шарнирную область, происходящую из внеклеточных областей мембранных белков типа 1, таких как CD8альфа, CD4, CD28 и CD7, которые могут быть шарнирными областями дикого типа от этих молекул или могут быть изменены. В одном варианте осуществления данного изобретения шарнирная область содержит шарнир CD8альфа (SEQ ID NO: 97).

"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 антигеном-мишенью. Трансмембранный домен может быть трансмембранным доменом CD3дзета, однако другие трансмембранные домены, которые могут применяться, включают те, которые получены из CD8альфа, CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В одном варианте осуществления данного изобретения трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD137. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трансмембранный домен является синтетическим, и в этом случае он может содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

"Внутриклеточный сигнальный домен" или "сигнальный домен" относится к части белка химерного антигенного рецептора, который участвует в трансляции сообщения об эффективном связывании CAR антигену-мишени 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 клетку-мишень, 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, помощь или активность, включая секрецию цитокина. Таким образом, термины "внутриклеточный сигнальный домен" или "сигнальный домен", применяемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к части белка, который трансдуцирует сигнал эффекторной функции и который направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя 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 передачи сигнала эффекторной функции. Внутриклеточный сигнальный домен также известен как "домен трансдукции сигнала" и обычно происходит из частей цепей CD3 или FcR $\gamma$  человека.

Известно, что сигналов, генерируемых только через рецептор Т-клетки, недостаточно для полной активации Т-клетки и что для этого также необходим 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 рецептор Т-клеток (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.

Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые конкретно применяются в данном изобретении, включают последовательности, полученные из TCRдзета, FcRгамма, FcRбета, CD3гамма, CD3дельта, CD3эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения внутриклеточный сигнальный домен описанных в данном документе CAR анти-BCMA происходит от CD3дзета. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100.

В данном контексте термин "костимулирующий сигнальный домен" или "костимулирующий домен" относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличающиеся от антигенных рецепторов или рецепторов Fc, 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 данном описании представлены типовые костимулирующие домены, происходящие из CD3дзета и 4-1BB, для применения с CAR, описанными в данном документе, рассматриваются и другие костимулирующие домены. Включение одного или большего количества костимулирующих сигнальных доменов может повысить эффективность и рост 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 данного изобретения костимулирующий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99.

Несмотря на то что CAR на основе scFv, сконструированные для содержания сигнального домена от CD3 или FcRгамма, как было продемонстрировано, доставляют мощный сигнал для активации Т-клеток и эффекторной функции, их недостаточно для выработки сигналов, которые способствуют выживанию и размножению Т-клеток в отсутствие сопутствующего костимулирующего сигнала. Другие CAR, содержащие связывающий домен, шарнир, трансмембранный и сигнальный домен, производный от CD3дзета или FcRгамма, вместе с одним или большим количеством костимулирующих сигнальных доменов (например, внутриклеточные костимулирующие домены, производные от CD28, CD137, CD134 и CD278) могут более эффективно направлять противоопухолевую активность, а также повышать секрецию цитокинов, литическую активность, выживаемость и пролиферацию в CAR-экспрессирующих Т-клетках *in vitro*, а также на моделях животных и у пациентов с раком (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).

В различных вариантах осуществления данного изобретения CAR ВСМА по данному изобретению содержат

- (a) анти-ВСМА scFv в качестве связывающего домена (например, scFv, имеющий связывающие области (например, CDR или вариабельные домены) из любого одного или большего количества антител ВСМА);
- (b) шарнирную область, полученную из CD8альфа человека;
- (c) трансмембранный домен CD8альфа человека; и
- (d) внутриклеточный сигнальный домен дзета-цепи CD3 (CD3) Т-клеточного рецептора человека и, возможно, один или большее количество костимулирующих сигнальных доменов, например 4-1BB.

В одном варианте осуществления данного изобретения различные белковые домены расположены от amino до карбоксильного конца в следующем порядке: связывающий домен, шарнирная область и трансмембранный домен. Внутриклеточный сигнальный домен и необязательные костимулирующие сигнальные домены связаны с трансмембранным карбокси-концом в любом порядке в тандеме с образованием одноцепочечного химерного полипептида. В одном варианте осуществления данного изобретения конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующей ВСМА CAR, представляет собой химерную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую различные кодирующие последовательности, например (от 5' до 3') кодирующие последовательности анти-ВСМА scFv человека, CD8альфа-шарнир человека, трансмембранный домен CD8альфа человека и внутриклеточный сигнальный домен CD3дзета. В другом варианте осуществления данного изобретения конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующей ВСМА CAR, представляет собой химерную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую различные кодирующие последовательности, например (от 5' до 3') кодирующие последовательности анти-ВСМА scFv человека, CD8альфа-шарнир человека, трансмембранный домен CD8альфа человека и костимулирующий домен CD3дзета.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотид, кодирующий описанный в данном документе CAR, вставляют в вектор. Указанный вектор представляет собой носитель, в который может быть ковалентно вставлен полинуклеотид, кодирующий белок, для того чтобы вызвать экспрессию этого белка и/или клонирование полинуклеотида. Такие векторы также могут называться "экспрессионными векторами". Выделенный полинуклеотид может быть вставлен в вектор с помощью любых пригодных способов, известных в данной области техники, например, без ограничения, вектор может быть расщеплен с применением соответствующих рестрикционных ферментов, а затем может быть лигирован с выделенным полинуклеотидом, имеющим совпадающие рестрикционные концы. Экспрессионные векторы обладают способностью 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. Экспрессионные векторы могут содержать множество контрольных последовательностей

стей, 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 экспрессионные векторы могут содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые также выполняют другие функции и обсуждаются ниже. Экспрессионный вектор может содержать дополнительные элементы, например, указанный экспрессионный вектор 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.

Указанный экспрессионный вектор может иметь необходимые регуляторные элементы 5' против хода транскрипции и 3' по ходу транскрипции, такие как промоторные последовательности, такие как промоторы CMV, PGK и EF1 альфа, последовательности распознавания рибосом и связывания ТАТА-бокса, а также последовательность терминации транскрипции 3' UTR AAUAAA для эффективной транскрипции и трансляции гена в соответствующей клетке-хозяине. Другие пригодные промоторы включают конститутивный промотор раннего промотора вируса 40 (SV40) обезьян, промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор HIV LTR, промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно-ранний промотор EBV и промотор вируса саркомы Рауса. Также можно применять промоторы генов человека, включая, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения индуцируемые промоторы также рассматриваются как часть векторов, экспрессирующих химерный антигенный рецептор. Это обеспечивает молекулярный переключатель, способный включить экспрессию или выключить экспрессию полинуклеотидной последовательности, представляющей интерес. Примеры индуцируемых промоторов включают, помимо прочего, промотор металлотионина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона или промотор тетрациклина.

Указанный экспрессионный вектор может иметь дополнительную последовательность, такую как теги бх-гистидин, с-Мус и FLAG, которые включены в экспрессируемые CAR. Таким образом, экспрессионный вектор 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 нуклеиновой (нуклеиновых) кислоты (кислот), представляющей интерес и переносимой на экспрессионном векторе. Экспрессионный вектор также может быть сконструирован для функции репликации и/или экспрессии (например, транскрипции и трансляции) в конкретном типе клетки, местоположении клетки или типе ткани. Экспрессионные векторы могут включать селективируемый маркер для сохранения вектора в клетке хозяина или реципиента.

В различных вариантах осуществления данного изобретения указанные векторы представляют собой плазмиду, автономно реплицирующиеся последовательности и мобильные элементы. Дополнительные типовые векторы включают, без ограничения, плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как дрожжевая искусственная хромосома (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома на основе P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, а также вирусы животных. Примеры категорий вирусов животных, применяемых в качестве векторов, включают, без ограничения, ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус и паповавирус (например, SV40). Примерами экспрессионных векторов являются векторы системы бицистронной экспрессии Lenti-X™ (Neo) (Clontech), векторы pCneo (Promega) для экспрессии в клетках млекопитающих; pLenti4/V5-DEST TM., pLenti6/V5-DEST TM. и pLenti6.2N5-GW/lacZ (Invitrogen) для опосредованного лентивирусом переноса генов и экспрессии в клетках млекопитающих. Кодирующие последовательности CAR, описанные в данном документе, могут быть лигированы в такие экспрессионные векторы для экспрессии химерного белка в клетках млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по данному изобретению, представлены в вирусном векторе. Вирусный вектор может происходить из ретровируса, лентивируса или пенящего вируса. В данном контексте термин "вирусный вектор" относится к векторной конструкции нуклеиновой кислоты, которая включает по меньшей мере один элемент вирусного происхождения и обладает способностью упаковываться в частицу вирусного вектора.

Вирусный вектор может содержать кодирующие последовательности для различных химерных белков, описанных в данном документе, вместо несущественных вирусных генов. Вектор и/или частицу можно использовать с целью переноса ДНК, РНК или других нуклеиновых кислот в клетки либо *in vitro*, либо *in vivo*. В данной области техники известны многочисленные формы вирусных векторов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения 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 происходят от ретровируса. Термин "лентивирусный вектор" относится к вектору, содержащему структурные и функциональные генетические элементы вне LTR, которые в основном происходят от лентивируса.

Ретровирусные векторы для применения в данном изобретении 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 обезьян гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошек (FLV), спумавирус, Френд, вирус стволовых клеток мыши (MSCV) и вирус саркомы Рауса (RSV)). Ретровирусы по данному изобретению также включают вирусы Т-клеточного лейкоза человека, HTLV-1 и HTLV-2, а также лентивирусное семейство ретровирусов, например, вирусы иммунодефицита человека, ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита лошадей (EIV) и другие классы ретровирусов.

Лентивирусный вектор для применения в данном изобретении относится к вектору, полученному из лентивируса, группы (или рода) ретровирусов, которые вызывают медленно развивающееся заболевание. Вирусы, включенные в эту группу, включают ВИЧ (вирус иммунодефицита человека; включая ВИЧ типа 1 и ВИЧ типа 2); вирус висна-маэди; вирус артрита-энцефалита коз; вирус инфекционной анемии лошадей; вирус иммунодефицита кошек (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV); и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). Приготовление рекомбинантного лентивируса можно осуществить с помощью способов согласно Dull et al. и Zufferey et al. (Dull et al., J. Virol., 1998, 72:8463-8471; и Zufferey et al., J. Virol., 1998, 72:9873-9880).

Ретровирусные векторы (т.е. как лентивирусные, так и нелентивирусные) для применения в настоящем изобретении могут быть составлены с помощью стандартных методов клонирования путем комбинирования 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 в 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; в патенте

США № 4868116; патенте США № 4980286; заявке PCT WO 89/07136; заявке PCT WO 89/02468; заявке PCT WO 89/05345; и заявке PCT WO 92/07573).

Пригодные источники для получения ретровирусных (т.е. как лентивирусных, так и нелентивирусных) последовательностей для применения при составлении 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.

Для экспрессии ВСМА-CAR, указанный вектор можно ввести в клетку-хозяин, чтобы обеспечить экспрессию полипептида в клетке-хозяине. Указанные экспрессионные векторы могут содержать множество элементов для контроля экспрессии, включая без ограничения промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, селективируемые маркеры и сигнальные последовательности. Эти элементы могут быть выбраны соответствующим образом специалистом в данной области техники, как описано выше. Например, промоторные последовательности могут быть выбраны так, чтобы способствовать транскрипции полинуклеотида в векторе. Пригодные промоторные последовательности включают, без ограничения, 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, чтобы обеспечить возможность отбора клеток-хозяев, вставленных с вектором, из тех, которые не являются, например, селективируемыми маркерами и могут быть генами, которые придают резистентность к антибиотикам. Сигнальные последовательности могут быть выбраны так, чтобы экспрессированный полипептид мог транспортироваться за пределы клетки-хозяина.

Для клонирования полинуклеотида, указанный вектор может быть введен 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, как правило, включая без ограничения точку начала репликации, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности и селективируемые маркеры. При необходимости эти элементы могут быть выбраны специалистом в данной области техники. Например, точка начала репликации может быть выбрана так, чтобы способствовать автономной репликации вектора в клетке-хозяине.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенные клетки-хозяева, содержащие представленные в данном документе векторы. Клетки-хозяева, содержащие вектор, могут быть пригодны для экспрессии или клонирования полинуклеотида, содержащегося в векторе. Пригодные клетки-хозяева могут включать, без ограничения, прокариотические клетки, грибковые клетки, дрожжевые клетки или высшие эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих. Пригодные



прокариотические клетки для этой цели включают, без ограничения, 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, такие как B. subtilis и B. licheniformis, Pseudomonas, такие как P. aeruginosa и Streptomyces.

CAR по данному изобретению вводят в клетку-хозяина с помощью методов трансфекции и/или трансдукции, известных в данной области техники. В данном контексте термины "трансфекция" и "трансдукция" относятся к процессам, посредством которых экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты вводится в клетку-хозяина. Указанная нуклеиновая кислота может быть интегрирована в ДНК клетки-хозяина или может сохраняться вне хромосом. Нуклеиновая кислота может сохраняться временно или может быть стабильной. Трансфекция может осуществляться различными способами, известными в данной области техники, включая, помимо прочего, совместную преципитацию фосфата кальция и ДНК, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, трансфекцию, опосредованную полибренном, электропорацию, микроинъекцию, слияние липосом, липофекцию, слияние протопластов, ретровирусную инфекцию и биолистику. Трансдукция относится к доставке гена(ов) с помощью вирусного или ретровирусного вектора посредством вирусной инфекции, а не путем трансфекции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ретровирусные векторы трансдуцируются путем упаковки векторов в вирионы до контакта с клеткой. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая ВСМА CAR, переносимого ретровирусным вектором, может быть трансдуцирована в клетку посредством инфекции и интеграции провируса.

В данном контексте термин "генно-инженерный" 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" применяются в данном документе взаимозаменяемо.

В частности, CAR по данному изобретению вводится и экспрессируется в иммунных эффекторных клетках, чтобы перенаправить их специфичность на антиген-мишень, представляющий интерес, например, злокачественную плазматическую клетку, например, клетку множественной миеломы.

В данном изобретении предлагаются способы получения иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют CAR, как описано в данном документе. В одном варианте осуществления данного изобретения указанный способ включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных от субъекта, такого как субъект, имеющий опухолевую клетку, экспрессирующую ВСМА, так что иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или большее количество CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения 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 данного изобретения иммунные эффекторные клетки сначала активируют и стимулируют для пролиферации *in vitro* перед их генетической модификацией для экспрессии CAR. В этом отношении иммунные эффекторные клетки можно культивировать до или после генетической модификации (т.е. трансдукции или трансфекции для экспрессии CAR, как описано в данном документе).

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, тимус, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта, с помощью любого количества методов, известных квалифицированному специалисту, таких как разделение FICOLL. В одном варианте осуществления данного изобретения клетки из циркулирующей крови индивидуума получают путем афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В одном варианте осуществления данного изобретения клетки, собранные с помощью афереза, можно промыть для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующей обработки. В одном варианте осуществления данного изобретения клетки промывают с применением PBS. В альтернативном варианте осуществления данного изобретения в промытом растворе отмечается недостаток кальция и магния, или может отмечаться недостаток многих, если не всех, двухвалентных катионов. Специалистам в данной области техники будет понятно, что этап промывки может выполняться способами, известными специалистам в данной области техники, например, с помощью полуавтоматической проточной центрифуги. После промывки клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах или другом солевом растворе с буфером или без него. В определенных вариантах осуществления данного изобретения нежелательные компоненты образца афереза можно удалить при непосредственном ресуспендировании клеток в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки выделяют из мононуклеар-

ных клеток периферической крови (PBMC) путем лизирования эритроцитов и деплетирования моноцитов, например, центрифугированием в градиенте PERCOLL™. Специфическая субпопуляция Т-клеток, таких как CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и CD45RO+ Т-клетки, может быть дополнительно выделена с помощью методов положительной или отрицательной селекции. Например, обогащение популяции Т-клеток путем отрицательной селекции можно осуществить с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отобранных клеток. Одним из способов применения для данного изобретения является сортировка и/или селекция клеток с помощью отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которой используется коктейль моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на отрицательно отобранных клетках. Например, для обогащения клеток CD4+ путем отрицательной селекции коктейль моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Проточную цитометрию и сортировку клеток также можно применять для выделения представляющих интерес популяций клеток для данного изобретения.

PBMC можно применять непосредственно для генетической модификации CAR с помощью способов, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, после выделения PBMC, дополнительно выделяют Т-лимфоциты, и в определенных вариантах осуществления данного изобретения, как цитотоксические, так и хелперные Т-лимфоциты могут быть отсортированы на субпопуляции наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток до или после генетической модификации и/или размножения. Клетки CD8+ можно получить с помощью стандартных методов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD8+ клетки дополнительно сортируют на наивные клетки, центральные клетки памяти и эффекторные клетки, идентифицируя поверхностные антигены клетки, которые ассоциированы с каждым из этих типов клеток CD8+. В вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки памяти присутствуют как в субпопуляциях CD62L+, так и в CD62L лимфоцитов периферической крови CD8+. PBMC сортируют на фракции CD62L-CD8+ и CD62L+CD8+ после окрашивания антителами анти-CD8 и анти-CD62L. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения экспрессия фенотипических маркеров центральных ТCM памяти включает CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и CD127 и является отрицательной в отношении гранзима В. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные Т-клетки памяти представляют собой CD45RO+, CD62L+, CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные Т-клетки отрицательны в отношении CD62L, CCR7, CD28 и CD127 и положительны в отношении гранзима В и перфорина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения наивные CD8+ Т-лимфоциты характеризуются экспрессией фенотипических маркеров наивных Т-клеток, включая CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 и CD45RA.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD4+ Т-клетки дополнительно сортируют на субпопуляции. Например, CD4+ Т-хелперные клетки можно разделить на наивные клетки, центральные клетки памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций, которые имеют антигены клеточной поверхности. CD4+ лимфоциты можно получить с помощью стандартных способов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения наивные CD4+ Т-лимфоциты представляют собой CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CD4+ клетки памяти являются CD62L-положительными и CD45RO-положительными. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные клетки CD4+ являются CD62L- и CD45RO-отрицательными.

Иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, могут быть генетически модифицированы после выделения с помощью 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 данного изобретения иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицируют посредством описанных в данном документе химерных антигенных рецепторов (например, трансдуцируют вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR), а затем активируют и размножают *in vitro*. Способы активации и размножения Т-клеток известны в данной области техники и описаны, например, в патентах США № 6905874; патенте США № 6867041; патенте США № 6797514; WO 2012079000. Как правило, такие способы включают приведение в контакт PBMC или выделенных Т-клеток со стимулирующим агентом и костимулирующим агентом, таким как антитела анти-CD3 и анти-CD28, обычно прикрепленные к грануле или другой поверхности, в культуральной среде с соответствующими цитокинами, такими как IL-2. Антитела анти-CD3 и анти-CD28, прикрепленные к одной и той же грануле, служат в качестве "суррогатных" антигенпрезентирующих клеток (APC). В других вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки могут быть активированы и стимулированы для пролиферации питающимися клетками и соответствующими антителами и цитокинами с помощью способов, таких как описанные в патенте США № 6040177; в патенте США № 5827642; и WO2012129514.

В данном изобретении предлагается популяция модифицированных иммунных эффекторных клеток для лечения пациента, страдающего злокачественным новообразованием, например опухолью, экспрессирующей ВСМА, например множественной миеломой, при этом модифицированные иммунные

эффекторные клетки содержат ВСМА-CAR, как описано в данном документе.

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки составляют, сначала собирая их из их культуральной среды, а затем промывая и концентрируя в среде и системе контейнеров, пригодных для введения ("фармацевтически приемлемый" носитель), в эффективном для лечения количестве. Пригодной инфузионной средой может быть любой состав изотонической среды, обычно физиологический солевой раствор, нормосол R (Normosol R) (Abbott) или плазма-лит А (Plasma-Lyte A) (Baxter), но также можно применять 5%-ный раствор декстрозы в воде или лактат Рингера. Указанная инфузионная среда может быть дополнена сывороточным альбумином человека.

Эффективное для лечения количество клеток в композиции составляет по меньшей мере 2 клетки (например, по меньшей мере 1 центральная CD8<sup>+</sup> Т-клетка памяти и по меньшей мере 1 подгруппа CD4<sup>+</sup> Т-клеток хелперов) или, как правило, больше чем 10 клеток и до 10 и включая 10 или 10 клеток, а также может быть больше 10 клеток. Количество клеток будет зависеть от конечного применения, для которого предназначена композиция, а также от типа содержащихся в ней клеток.

Клетки могут быть аутологичными или гетерологичными для пациента, получающего терапию. Если желательно, лечение может также включать введение митогенов (например, РНА) или лимфокинов, цитокинов и/или хемокинов (например, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-18, и TNF- $\beta$ , GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 $\alpha$  и т.д.), как описано в данном документе, для усиления индукции иммунного ответа.

Популяции экспрессирующих CAR иммунных эффекторных клеток по данному изобретению можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как IL-2 или другими цитокинами или популяции клеток. Вкратце, фармацевтические композиции по данному изобретению могут включать популяцию экспрессирующих CAR иммунных эффекторных клеток, таких как Т-клетки, как описано в данном документе, в комбинации с одним или большим количеством фармацевтически или физиологически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический солевой раствор, забуференный фосфатом физиологический солевой раствор и тому подобное; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннитол; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по данному изобретению предпочтительно составляют для внутривенного введения.

Противоопухолевый иммунный ответ, индуцированный у субъекта введением CAR-экспрессирующих Т-клеток, описанных в данном документе, с применением описанных в данном документе способов или других способов, известных в данной области техники, может включать клеточные иммунные ответы, опосредованные цитотоксическими Т-клетками, способными уничтожить инфицированные клетки, а также 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 данному изобретению, можно применять различные способы, которые хорошо описаны в данной области техники; например, Current Protocols in Immunology, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Krusisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001), John Wiley & Sons, NY, N.Y.

Таким образом, в данном изобретении предлагаются способы лечения индивидуума, у которого диагностировано или подозревается наличие или риск развития гемопозитического злокачественного образования, частично характеризующегося аномальным накоплением продуцирующих иммуноглобулин плазматических клеток в костном мозге, например, при множественной миеломе, включающие введение индивиду терапевтически эффективного количества CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток, как описано в данном документе.

В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ лечения субъекта, у которого диагностирован рак, экспрессирующий ВСМА, включающий удаление эффекторных иммунных клеток у субъекта, у которого диагностирован рак, экспрессирующий ВСМА, и генетическую модификацию указанных эффекторных иммунных клеток вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор по данному изобретению, получая тем самым популяцию модифицированных эффекторных иммунных клеток и вводя популяцию модифицированных эффекторных иммунных клеток одному и тому же субъекту. В одном варианте осуществления данного изобретения указанные эффекторные иммунные клетки содержат Т-клетки.

Способы введения описанных в данном документе клеточных композиций включают любой способ, который эффективен для повторного введения ex vivo генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые либо непосредственно экспрессируют CAR по данному 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 данным изобретением и возвращение трансдуцированных клеток субъекту.

Связывающие свойства химерных антигенных рецепторов и соответствующих антител.

В данном документе термин "связывание" в контексте связывания химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела с любым, например, заранее определенным антигеном, таким как белок клеточной поверхности или его фрагмент, обычно относится к взаимодействию или ассоциации между минимум двумя объектами или молекулярными структурами, например, взаимодействие "антиген-связывающий домен - антиген".

Например, аффинность связывания обычно соответствует значению  $K_D$  около  $10^{-7}$  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. (SPR) в приборе BIAcore 3000 с применением антигена в качестве лиганда и антитела или рецептора химерного антигенного рецептора в качестве анализата (или антилиганда). Стратегии связывания на основе клеток, такие как анализы связывания с сортировкой флуоресцентно-активируемых клеток (FACS), также применяются в рутинной практике, при этом данные FACS хорошо коррелируют с другими методами, такими как конкурентное связывание радиолигандов и SPR (Benedict, CA, J. Immunol Methods, 1997, 201(2):223-31; Geuijen, C.A., et al., J. Immunol. Methods, 2005, 302(1-2):68-77).

Соответственно химерный антигенный рецептор или соответствующее антитело по данному изобретению связывается с предварительно определенным антигеном или молекулой (рецептором) на клеточной поверхности, имеющей аффинность, соответствующую значению  $K_D$ , которое по меньшей мере в десять раз ниже, чем его аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином). Согласно данному изобретению, если аффинность химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела имеет значение  $K_D$ , равное или менее чем в 10 раз ниже, по сравнению с неспецифическим антигеном, это можно рассматривать как необнаруживаемое связывание.

Термин " $K_D$ " (М) относится к равновесной константе диссоциации взаимодействия "конкретный антиген-связывающий домен - антиген" или к равновесной константе диссоциации соответствующего антитела к антигену. Существует обратная зависимость между  $K_D$  и аффинностью связывания, поэтому чем меньше значение  $K_D$ , тем выше, т.е. сильнее, аффинность. Таким образом, термины "более высокая аффинность" или "более сильная аффинность" относятся к более высокой способности образовывать взаимодействие и, следовательно, к меньшему значению  $K_D$ , и, наоборот, термины "более низкая аффинность" или "более слабая аффинность" относятся к более низкой способности образовывать взаимодействие и, следовательно, большему значению  $K_D$ . В некоторых случаях, более высокая аффинность связывания (или  $K_D$ ) конкретной молекулы (например, химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела) к ее взаимодействующей молекуле-партнеру (например, антигену X) по сравнению с аффинностью связывания молекулы (например, химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела) к другой взаимодействующей молекуле-партнеру (например, антигену Y) может быть выражена как отношение связывания, определяемое делением большего значения  $K_D$  (более низкая или более слабая аффинность) на меньшее  $K_D$  (более высокая или более сильная аффинность), например, выраженное как в 5 или 10 раз больше аффинности связывания, в зависимости от обстоятельств.

Термин " $k_d$ " (сек<sup>-1</sup> или 1/с) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия "антиген-связывающий домен - антиген" или константе скорости диссоциации химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела. Указанное значение также называется значением  $k_{off}$ .

Термин " $k_a$ " (М<sup>-1</sup>×сек<sup>-1</sup> или 1/М) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия "антиген-связывающий домен - антиген" или константе скорости ассоциации химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела.

Термин " $K_A$ " (М<sup>-1</sup> или 1/М) относится к константе равновесия ассоциации конкретного взаимодействия "антиген-связывающий домен - антиген" или константе равновесия ассоциации химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела. Константу равновесия ассоциации получают делением  $k_a$  на  $k_d$ .

Термин " $EC_{50}$ " или " $EC_{50}$ " относится к половине максимальной эффективной концентрации, которая включает в себя концентрацию химерного антигенного рецептора, которая индуцирует ответ наполовину между исходным значением и максимумом после указанного времени воздействия.  $EC_{50}$  по существу представляет собой концентрацию химерного антигенного рецептора, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, значение  $EC_{50}$  равно концентрации химерного антигенного рецептора или соответствующего антитела согласно данному изобретению, которая дает половину максимального связывания с клетками, экспрессирующими антиген (например, ассоциированный с опухолью антиген, такой как ВСМА), что определяется, например, с помощью анализа связывания FACS. Таким образом, сниженное или более слабое связывание наблюдается при повышенном  $EC_{50}$  или половине максимальной эффективной концентрации.

В одном варианте осуществления данного изобретения пониженное связывание можно определить как повышенную концентрацию  $EC_{50}$  химерного антигенного рецептора или соответствующую концентрацию антитела, которая делает возможным связывание с половиной максимального количества клеточных мишеней.

Варианты последовательностей химерного антигенного рецепторов.

Химерные антигенные рецепторы или данное изобретение могут включать одну или большее количество аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях 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 описанных в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Химерные антигенные рецепторы согласно данному изобретению могут содержать антигенсвязывающие домены, которые получают из любой из типовых последовательностей CDR или аминокислотных последовательностей переменной области, описанных в данном документе, в которых одна или большее количество аминокислот в пределах одной или большего количества каркасных и/или CDR областей мутируют в соответствующий(ие) остаток(и) последовательности зародышевой линии, из которой было получено соответствующее антитело, или в соответствующий(ие) остаток(и) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе совместно как "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области техники, начиная с описанных в данном документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко продуцировать многочисленные антитела, которые содержат одну или большее количество индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, все каркасные и/или CDR-остатки в доменах  $V_H$  и/или  $V_L$  мутируют обратно в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой был получен антигенсвязывающий домен. В других вариантах осуществления данного изобретения только определенные остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления данного изобретения, один или большее количество каркасных и/или CDR остатков мутируют в соответствующий остаток(ки) последовательности другой зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально был получен антигенсвязывающий домен). Дополнительно антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию из двух или больше мутаций зародышевой линии в пределах каркаса и/или областей CDR, например, в которых определенные отдельные остатки мутируют в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или мутируют в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии.

Биологические характеристики химерных антигенных рецепторов и соответствующих антител.

Данное изобретение включает химерные антигенные рецепторы с антигенсвязывающими доменами, происходящими из антител, которые связывают ВСМА человека с высокой аффинностью (например, с наномолярными или суб-наномолярными значениями  $K_D$ ).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, данное изобретение включает химерные антигенные рецепторы с антигенсвязывающими доменами, происходящими из соответствующих антител, которые связывают ВСМА человека с высокой аффинностью (например, при 25°C) с  $K_D$  менее около 5 нМ, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соответствующие антитела связывают ВСМА со значением  $K_D$  меньше чем около 20 нМ, меньше чем около 10 нМ, меньше чем около 8 нМ, меньше чем около 7 нМ, меньше чем около 6 нМ, меньше чем около 5 нМ, меньше чем около 4 нМ, меньше чем около 3 нМ, меньше чем около 2 нМ, меньше чем около 1 нМ, меньше чем около 800 пМ, меньше чем около 700 пМ, меньше чем около 500 пМ, меньше чем около 400 пМ, меньше чем около 300 пМ, меньше чем около 200 пМ, меньше чем около 100 пМ, меньше чем около 50 пМ или меньше чем около 25 пМ, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Данное изобретение также включает химерные антигенные рецепторы с антигенсвязывающими доменами, происходящими от соответствующих антител, которые связывают ВСМА с диссоциативным периодом полужизни ( $t_{1/2}$ ) большим чем около 10 мин или большим чем около 125 мин, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C. В определенных вариантах осуществления данного изобретения соответствующие антитела связывают ВСМА с  $t_{1/2}$ , большим чем около 3 мин, большим чем около 4 мин, большим чем около 10 мин, большим чем около 20 мин, большим чем около 30 мин, большим чем около 40 мин, большим чем около 50 мин, большим чем около 60 мин, большим чем

около 70 мин, большим чем около 80 мин, большим чем около 90 мин, большим чем около 100 мин, большим чем около 110 мин или большим чем около 120 мин, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

Данное изобретение также включает химерные антигенные рецепторы с антигенсвязывающими доменами, происходящими из соответствующих антител, которые специфически связываются с линиями клеток человека, которые экспрессируют эндогенный ВСМА (например, NCI-H929, MOLP-8 или OMP-2), что определено анализом связывания FACS.

Данное изобретение также включает сконструированные клетки, экспрессирующие ВСМА-специфические химерного антигенного рецептора, которые

(i) активируются ВСМА-экспрессирующими клетками; и/или

(ii) проявляют ингибирование роста опухоли у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты множественной миеломы человека.

Приготовление антигенсвязывающих доменов.

Антигенсвязывающие домены химерных антигенных рецепторов по данному изобретению, которые специфичны для определенных антигенов (например, ВСМА), могут быть получены с помощью любой технологии генерации антител, известной в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество отдельных компонентов (например, тяжелая и легкая цепи) соответствующих антител по данному изобретению получают из химерных, гуманизованных или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области техники. Например, одна или большее количество тяжелых и/или легких цепей могут быть получены с помощью технологии VELOCIMMUNE™. С помощью технологии VELOCIMMINE™ (или любой другой технологии получения человеческих антител), первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела к конкретному антигену (например, ВСМА), имеющим переменную область человека и константную область мыши. Антитела охарактеризованы и отобраны по желательным характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Как обсуждается в данном документе, эти переменные области человека (или CDR) могут быть затем включены в антигенсвязывающие домены химерного антигенного рецептора.

Полинуклеотиды и векторы.

Данное изобретение также относится к полинуклеотидам и векторам, кодирующим химерные антигенные рецепторы, обсуждаемые в данном документе.

В различных вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотид может содержать экспрессионную кассету или экспрессионный вектор (например, плазмиду для введения в бактериальную клетку-хозяин, или вирусный вектор, такой как бакуловиральный вектор для трансфекции клетки-хозяина насекомого, или плазмиду или вирусный вектор), вектор, такой как лентивирус, для трансфекции клетки-хозяина млекопитающего).

В различных вариантах осуществления данного изобретения указанные полинуклеотиды и/или векторы содержат молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87 или SEQ ID NO: 89. В различных вариантах осуществления данного изобретения указанные полинуклеотиды и/или векторы содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 90. В различных вариантах осуществления данного изобретения указанные полинуклеотиды и/или векторы содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99 или SEQ ID NO: 100.

Методы инженерии иммунных клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы.

Данное изобретение включает способы получения иммунных клеток для иммунотерапии, включающие введение *ex vivo* в такие иммунные клетки полинуклеотидов или векторов, кодирующих один из ВСМА-специфических химерных антигенных рецепторов, описанных в данном документе.

Данное изобретение также включает иммунные клетки, содержащие полинуклеотид или лентивирусный вектор, кодирующий один из ВСМА-специфических рецепторов химерного антигена, обсуждаемых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эти иммунные клетки применяют для иммунотерапии (например, для лечения рака).

Данное изобретение также включает способы генетической модификации иммунных клеток, чтобы сделать их более подходящими для аллогенной трансплантации. Согласно первому аспекту иммунная клетка может быть изготовлена аллогенной, например, путем инактивации по меньшей мере одного гена, экспрессирующего один или большее количество 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. В соответствии с дополнительным аспектом данного 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.

Иммунные клетки, содержащие химерный антигенный рецептор по данному изобретению (или сконструированные иммунные клетки), являются другим объектом данного изобретения. В некоторых случаях указанная иммунная клетка является иммунной эффекторной клеткой. В некоторых случаях указанная иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых случаях указанная иммунная клетка представляет собой Т-лимфоцит, выбранный из воспалительного Т-лимфоцита, цитотоксического Т-лимфоцита, регуляторного Т-лимфоцита или Т-лимфоцита-хелпера. В некоторых случаях указанная иммунная клетка представляет собой цитотоксический CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцит.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированная иммунная клетка представляет собой Т-клетку человека, содержащую химерный антигенный рецептор, содержащий от N-конца до C-конца

(a) внеклеточный лигандсвязывающий домен, содержащий домен одноцепочечного вариабельного фрагмента анти-BCMA (scFv), содержащий вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR);

(b) шарнир;

(c) трансмембранный домен; и

(d) цитоплазматический домен, содержащий костимуляторный домен и сигнальный домен

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения домен scFv сконструированной Т-клетки человека содержит пару аминокислотных последовательностей LCVR/HCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10/2, 26/18, 42/34, 58/50 или 74/66. В некоторых случаях шарнир содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97. В некоторых случаях трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98. В некоторых случаях костимулирующий домен представляет собой костимулирующий домен 4-1BB. В некоторых случаях костимулирующий домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99. В некоторых случаях сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3зета. В некоторых случаях сигнальный домен CD3зета содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100.

В различных вариантах осуществления данного изобретения сконструированная Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 90.

Биоэквиваленты.

Данное изобретение охватывает химерные антигенные рецепторы и сконструированные клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы, которые имеют аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых типовых молекул, описанных в данном документе, но которые сохраняют способность связывать BCMA, активируют иммунные клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы в присутствии BCMA-экспрессирующих клеток или подавляют рост или пролиферацию BCMA-экспрессирующих опухолевых клеток. 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.

В одном варианте осуществления данного изобретения две сконструированные иммунные клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор по данному изобретению, являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и активности.

В одном варианте осуществления данного изобретения две сконструированные иммунные клетки являются биоэквивалентными, если для пациента можно один или большее количество раз чередовать эталонный продукт и биологический продукт без ожидаемого увеличения риска нежелательных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности по сравнению с продолжением терапии без такого чередования.

В одном варианте осуществления данного изобретения две сконструированные иммунные клетки являются биоэквивалентными, если они обе действуют посредством общего механизма или механизмов действия для состояния или условий применения в той степени, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с помощью способов *in vivo* и *in vitro*. Варианты оценки биоэквивалентности включают, например,

(a) тест *in vivo* на людях или 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* на людях или других млекопитающих, в котором динамика соответствующего фармакологического действия сконструированной клетки (или ее мишени), измеряется как функция времени; и

(d) в хорошо контролируемом клиническом исследовании, в котором устанавливается безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты типовых сконструированных клеток, указанных в данном документе, могут быть сконструированы, например, путем осуществления 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.

В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном изобретении предлагаются антигенсвязывающие домены, которые связываются с ВСМА человека, но не с ВСМА других видов. Данное изобретение также включает антигенсвязывающие домены, которые связываются с ВСМА человека и с ВСМА одного или большего количества видов, не относящихся к человеку.

В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном изобретении предлагаются антигенсвязывающие домены, которые связывают ВСМА человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одним или большим количеством ВСМА: мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мармозетки, макаки-резус или шимпанзе.

Активация и рост сконструированных иммунных клеток.

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 настоящего изобретения изобретение может быть дополнительно активировано и расширено, 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 публикация заявки на патент США № 20060121005. Т-клетки можно размножить *in vitro* или *in vivo*.

Как правило, Т-клетки по данному изобретению размножаются путем контакта с агентом, который стимулирует комплекс CD3 TCR и костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток, чтобы создать сигнал активации для Т-клетки. Для создания сигнала активации для Т-клетки можно применять, например, химические вещества, такие как ионофор кальция A23187, форбол 12-миристат 13-ацетат (РМА) или митогенные лектины, такие как фитогемагглютинин (РНА).

В качестве неограничивающих примеров популяции Т-клеток можно стимулировать *in vitro*, например, путем контакта с антителом анти-CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом или антителом анти-CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем контакта с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с ионофором кальция. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток применяется лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяция Т-клеток может контактировать с антителом анти-CD3 и антителом анти-CD28 в условиях, пригодных для стимуляции пролиферации Т-клеток. Условия, пригодные для культивирования Т-клеток, включают пригодную среду (например, Minimal Essential Media или RPMI Media 1640 или X-vivo 5, (Lonza)), которая может содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, фетальная бычья или человеческая сыворотка), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN-g, 1L-4, 1L-7, GM-CSF, IL-10, IL-2, 1L-15, TGF $\beta$  и TNF- $\alpha$  или любые другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области техники. Другие добавки для роста клеток включают, помимо прочего, поверхностно-активное вещество, плазманат и восстанавливающие агенты, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среда может включать RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 1 и X-Vivo 20, оптимизатор с добавленными аминокислотами, пируватом натрия и витаминами, либо без сыворотки, либо с добавлением соответствующего количества сыворотки (или плазмы), или определенного набора гормонов и/или количества цитокина(ов), достаточного для роста и размножения Т-клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, включаются только в экспериментальные культуры, но не в культуры клеток, которые должны быть введены субъекту. Клетки-мишени поддерживаются в условиях, необходимых для поддержания роста, например, при соответствующей температуре (например, 37°C) и атмосфере (например, воздух плюс 5% O<sub>2</sub>). Т-клетки, подвергшиеся воздействию различного времени стимуляции, могут иметь разные характеристики.

В другом конкретном варианте осуществления данного изобретения указанные клетки могут быть размножены путем совместного культивирования с тканью или клетками. Указанные клетки также можно размножить *in vivo*, например, в крови субъекта после введения указанной клетки субъекту.

Терапевтическое применение.

Данное изобретение включает композиции, содержащие сконструированную клетку (например, Т-клетку), экспрессирующую химерный антигенный рецептор по данному изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых случаях сконструированные клетки образуют лекарственное средство, особенно для иммунотерапии. В некоторых случаях сконструированные клетки применяются для лечения рака (например, множественной миеломы). В некоторых случаях сконструированные клетки применяются в изготовлении лекарственного средства для иммунотерапии и/или лечения рака (например, рака, экспрессирующего ВСМА).



В данном изобретении предлагаются способы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей сконструированную клетку (например, Т-клетку), экспрессирующую химерный антигенный рецептор, как описано 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. В контексте данного документа, выражение "нуждающийся в этом субъект" обозначает человека или животное, отличное от человека, которое проявляет один или большее количество симптомов или признаков рака (например, субъект с опухолью или страдающий от любого из видов рака, упомянутых в данном документе), или который иным образом получает пользу от ингибирования или снижения активности ВСМА или деплетирования ВСМА+ клеток (например, клеток множественной миеломы).

Сконструированные клетки по данному изобретению являются пригодными, среди прочего, для лечения любого заболевания или нарушения, при котором стимуляция, активация и/или нацеливание иммунного ответа могут быть полезными. В частности, сконструированные клетки по данному изобретению можно применять для лечения, предотвращения и/или облегчения любого заболевания или нарушения, ассоциированного с или опосредованного экспрессией ВСМА, или активностью или пролиферацией клеток ВСМА+. Клетки, экспрессирующие ВСМА, которые могут быть ингибированы или уничтожены с помощью сконструированных клеток по данному изобретению, включают, например, клетки множественной миеломы.

Сконструированные клетки по данному изобретению можно применять для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией ВСМА, включая, например, рак, в том числе множественную миелому, или другой рак В-клеток или плазматических клеток, такой как макроглобулинемия Вальденстрема, лимфома Беркитта и диффузная В-крупноклеточная лимфома. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ВСМА-экспрессирующее заболевание или нарушение представляет собой болезнь Кастлемана, лимфомаплазматическую лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому из мантийных клеток, лимфому маргинальной зоны, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому или хронический лимфоцитарный лейкоз. Согласно некоторым вариантам осуществления данного изобретения сконструированные клетки являются пригодными для лечения пациента, страдающего множественной миеломой. Согласно другим родственным вариантам осуществления данного изобретения предлагаются способы, включающие введение сконструированной клетки, как описано в данном документе, пациенту, страдающему множественной миеломой.

Аналитические/диагностические методы, известные в данной области техники, такие как сканирование опухолей и т.д., можно применять, чтобы установить, является ли пациент носителем множественной миеломы или другого рака В-клеточного происхождения.

Данное изобретение также включает в себя способы лечения остаточного рака у субъекта. В данном контексте термин "остаточный рак" означает наличие или сохранение одной или большего количества раковых клеток у субъекта после проведения противораковой терапии.

В соответствии с некоторыми аспектами, в данном изобретении предлагаются способы лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией ВСМА (например, множественной миеломы), включающие введение популяции сконструированных клеток, описанных в другом месте данного документа, субъекту после того, как у субъекта было установлен диагноз множественной миеломы.

Например, данное изобретение включает способы лечения множественной миеломы, включающие введение сконструированных иммунных клеток пациенту 1, 2, 3, 4, 5, 6 дней, 1, 2, 3 или 4 недели, 2, 4, 6, 8 месяцев, 1 год или более после того, как субъект получил другую иммунотерапию или химиотерапию.

Обсуждаемые в данном документе способы лечения могут быть уменьшающими интенсивность заболевания, лечебными или профилактическими. Лечение может быть частью аутологичной иммунотерапии или частью аллогенной иммунотерапии. Под термином "аутологичные" подразумевается, что клетки, линия клеток или популяция клеток, применяемые для лечения пациентов, происходят от пациента или от донора, совместимого по лейкоцитарному антигену человека (HLA). Под термином "аллогенные" подразумевается, что клетки, линия клеток или популяция клеток, применяемые для лечения пациентов, происходят не от пациента, а от донора.

В данном документе описаны клетки, которые можно применять с описанными способами. Лечение можно применять у пациентов, у которых диагностировано предзлокачественное или злокачественное раковое состояние, характеризующееся наличием клеток, экспрессирующих ВСМА, в частности, с избытком клеток, экспрессирующих ВСМА. Такие состояния встречаются при раке, например, множественной миеломе.

Типы рака, подлежащие лечению сконструированными клетками по данному изобретению, включают, помимо прочего, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, лимфому Беркитта и диффузную В-крупноклеточную лимфому, а также другие В-клеточные или плазматические раковые образования. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированные клетки можно применять для лечения заболевания или нарушения, экспрессирующего ВСМА, такого как болезнь Кастлемана, лимфомаплазматическая лимфома, фолликулярная лимфома, лимфома из мантийных клеток, лимфома маргинальной зоны, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома или хронический

лимфоцитарный лейкоз.

Композиции и способы по данному изобретению можно применять для лечения субъекта, который был охарактеризован как имеющий клетки или ткани, экспрессирующие ВСМА, или с подозрением на наличие клеток или тканей, экспрессирующих ВСМА. Например, пациенты, которым лечение по данному изобретению приносит пользу, включают субъектов с множественной миеломой.

Введение клеток или популяции клеток согласно данному изобретению можно осуществлять любым удобным способом, включая ингаляцию аэрозоля, инъекцию, прием внутрь, переливание, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в данном документе, можно вводить пациенту подкожно, внутривенно, внутримышечно, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, посредством внутривенной или внутримышечной инъекции или внутривенно. В одном варианте осуществления данного изобретения клеточные композиции по данному изобретению предпочтительно вводят посредством внутривенной инъекции.

Введение клеток или популяции клеток может состоять из введения от  $10^4$  до  $10^9$  клеток на кг веса тела, предпочтительно от  $10^5$  до  $10^6$  клеток/кг веса тела, включая все целые значения числа клеток в этих диапазонах. Клетки или популяция клеток можно вводить в одной или большем количестве доз. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффективное количество клеток вводят в виде разовой дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения 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. Несмотря на то что индивидуальные потребности варьируются, 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 веса реципиента, вида сопутствующего лечения, если таковое имеется, частоты лечения и характера желаемого эффекта.

В одном варианте осуществления данного изобретения эффективное количество клеток или композиции, содержащей эти клетки, вводят парентерально. Это введение может быть внутривенным. В некоторых случаях введение можно осуществлять непосредственно путем инъекции внутрь опухоли.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки вводят пациенту в сочетании (например, до, одновременно или после) с любым количеством пригодных способов лечения, включая, помимо прочего, лечение такими агентами, как противовирусные препараты, цидофовир и интерлейкин-2, цитарабин (также известным как ARA-C), или натализумаб для пациентов с рассеянным склерозом, или эфализумаб для пациентов с псориазом или с другими видами лечения для пациентов с PML. В дополнительных вариантах осуществления Т-клетки по данному изобретению можно применять в комбинации с химиотерапией, лучевой терапией, иммунодепрессантами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антителами или другими иммуноаблативными агентами, такими как CAMPATH, антитела анти-CD3, или другими антителами, цитоксином, флударибином, циклоспорином, FK506, рапамицином, микопиеноловой кислотой, стероидами, FR901228, цитокинами и лучевой терапией.

В дополнительном варианте осуществления данного изобретения клеточные композиции по данному изобретению вводят пациенту в сочетании с (например, до, одновременно или после) трансплантацией костного мозга, абляционной терапией, направленной на Т-клетки, с применением химиотерапевтических агентов, таких как флударабин, наружной дистанционной лучевой терапией (XRT), циклофосфамидом или антителами, такие как ОКТ3 или CAMPATH. В другом варианте осуществления данного изобретения клеточные композиции по данному изобретению вводят после абляционной терапией, направленной на В-клетки, например, с применением агентов, которые вступают в реакцию с CD20, например, ритуксан. Например, в одном варианте осуществления данного изобретения субъекты могут получать стандартное лечение с применением высокодозовой химиотерапии с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения после трансплантации субъекты получают инфузию размноженных иммунных клеток по данному изобретению. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения размноженные клетки вводят до или после операции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения любые способы (например, хирургическое вмешательство, химиотерапия или лучевая терапия) могут применяться для уменьшения опухолевой нагрузки перед введением размноженных иммунных клеток по данному изобретению. В одном варианте осуществления данного изобретения уменьшение опухолевой нагрузки до введения сконструированных клеток по данному изобретению может снизить вероятность или предотвратить синдром высвобождения цитокинов или цитокиновый шторм, побочный эффект, который может быть ассоциирован с терапией CAR Т-клетками.

Комбинированные виды терапии.

В данном изобретении предлагаются способы, которые включают введение сконструированных клеток или популяции клеток, содержащих любой из химерных антигенных рецепторов, описанных в

данном документе, в комбинации с одним или большим количеством дополнительных терапевтических агентов. Примеры дополнительных терапевтических агентов, которые можно комбинировать или вводить в комбинации с клетками или популяцией клеток по данному изобретению, включают, например, противоопухолевый агент (например, химиотерапевтический агент, включая мелфалан, винкристин (Онковин), циклофосфамид (Цитоксан), этопозид (VP-16), доксорубин (Адриамицин), липосомальный доксорубин (Доксил), обендамусти (Треанда), или любые другие препараты, которые, как известно, эффективны при лечении опухолей из плазматических клеток у субъекта). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второй терапевтический агент включает стероиды. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второй терапевтический агент включает целевые (таргетные) препараты, включая талидомид, леналидомид и бортезомиб, которые одобрены для лечения пациентов с впервые выявленной патологией. Леналидомид, помалидомид, бортезомиб, карфилзомиб, панобиностат, иксазомиб, элутузумаб и даратумумаб являются примерами второго терапевтического агента, эффективного для лечения рецидивирующей миеломы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второй терапевтический агент представляет собой схему, включающую лучевую терапию или трансплантацию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второй терапевтический агент может представлять собой иммуномодулирующий агент. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второй терапевтический агент может представлять собой ингибитор протеасом, включая бортезомиб (Велкейд), карфилзомиб (Кипролис), иксазомиб (Нинларо). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второй терапевтический агент может представлять собой ингибитор гистондеацетилазы, такой как панобиностат (Фаридак). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второй терапевтический агент может представлять собой моноклональное антитело, конъюгат антитело-препарат, 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 данному изобретению, включают ингибиторы цитокинов, включая ингибиторы низкомолекулярных цитокинов 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 согласно данному изобретению (например, фармацевтические композиции, содержащие сконструированные клетки или популяции клеток, как описано в данном документе) также можно вводить как часть терапевтической схемы, включающей в себя одну или большее количество терапевтических комбинаций, выбранных из: моноклонального антитела, отличающегося от описанных в данном документе, которое может взаимодействовать с другим антигеном на поверхности плазматических клеток, биспецифического антитела, которое имеет одно плечо, которое связывается с антигеном на поверхности опухолевых клеток, и другое плечо, которое связывается с антигеном на Т-лимфоците, конъюгата антитело-препарат, биспецифического антитела, конъюгированного с противоопухолевым агентом, ингибитора контрольной точки, например, того, который нацелен на PD-1 или CTLA-4, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ингибиторы контрольной точки могут быть выбраны из ингибиторов PD-1, таких как пембролизумаб (Кейтруда), ниволумаб (Опдиво) или сепиплимаб (REGN2810). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ингибиторы контрольной точки могут быть выбраны из ингибиторов PD-L1, таких как атезолизумаб (Тецентрик), авелумаб (Бавенцио) или дурвалумаб (Имфинзи)). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ингибиторы контрольной точки могут быть выбраны из ингибиторов CTLA-4, таких как ипилиумаб (Ервой).

Данное изобретение также включает в себя терапевтические комбинации, содержащие любые сконструированные клетки или популяции клеток, упомянутые в данном документе, и ингибитор одного или большего количества из VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, уроплакина или любого из вышеупомянутых цитокинов, при этом ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, миРНК, пептидное антитело, нанотело или фрагмент антитела (например, фрагмент Fab; фрагмент F(ab')<sub>2</sub>; фрагмент Fd; фрагмент Fv; scFv; фрагмент dAb; или другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела, мини-тела и минимальные блоки распознавания). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированные клетки или популяция клеток по данному изобретению также можно вводить как часть схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или обычную химиотерапию.

Дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить непосредственно до, одновременно или вскоре после введения сконструированных клеток согласно данному изобретению; (для целей данного изобретения такие схемы введения рассматриваются как введение сконструированных клеток "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом).

Данное изобретение включает в себя фармацевтические композиции, в которых сконструированную клетку или популяцию клеток согласно данному изобретению совместно готовят с одним или большим количеством дополнительных терапевтически активных компонентов, как описано в другом месте в данном документе.

### Схемы введения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления данного изобретения субъекту можно вводить множество доз сконструированных клеток в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение субъекту множества доз указанных клеток согласно настоящему изобретению. В данном контексте термин "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 данном изобретении предлагаются способы, включающие последовательное введение пациенту разовой начальной дозы с последующими одной или большим количеством вторичных доз и, необязательно, с последующей одной или большим количеством третичных доз.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения сконструированных клеток согласно данному 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. В определенных вариантах осуществления данного изобретения 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 данного изобретения 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").

В некоторых типовых вариантах осуществления данного изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через от 1 до 26 (например, через 1, 1<sup>1/2</sup>, 2, 2<sup>1/2</sup>, 3, 3<sup>1/2</sup>, 4, 4<sup>1/2</sup>, 5, 5<sup>1/2</sup>, 6, 6<sup>1/2</sup>, 7, 7<sup>1/2</sup>, 8, 8<sup>1/2</sup>, 9, 9<sup>1/2</sup>, 10, 10<sup>1/2</sup>, 11, 11<sup>1/2</sup>, 12, 12<sup>1/2</sup>, 13, 13<sup>1/2</sup>, 14, 14<sup>1/2</sup>, 15, 15<sup>1/2</sup>, 16, 16<sup>1/2</sup>, 17, 17<sup>1/2</sup>, 18, 18<sup>1/2</sup>, 19, 19<sup>1/2</sup>, 20, 20<sup>1/2</sup>, 21, 21<sup>1/2</sup>, 22, 22<sup>1/2</sup>, 23, 23<sup>1/2</sup>, 24, 24<sup>1/2</sup>, 25, 25<sup>1/2</sup>, 26, 26<sup>1/2</sup> 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.

Способы согласно этому аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз. Например, в отдельных вариантах осуществления данного изобретения пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления данного изобретения пациенту вводят две или большее количество (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или большее количество) вторичных доз. Аналогично, в определенных вариантах осуществления данного изобретения пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления данного изобретения пациенту вводят две или большее количество (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или большее количество) третичных доз.

В вариантах осуществления данного изобретения, 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 вводиться субъекту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом в вариантах осуществления данного изобретения, 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 альтернативном варианте, частота, с которой субъекту вводят вторичные и/или третичные дозы, может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения может также корректироваться лечащим врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

### Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное понимание и описание того, как разрабатывать и применять способы и композиции согласно данному изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении применяемых чисел (например, количеств, температур и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, и давление находится на уровне или около атмосферного.

Пример 1. Получение антител анти-BCMA.

Антитела анти-BCMA получали путем иммунизации генетически модифицированной мыши антигеном BCMA человека (например, hBCMA, SEQ ID NO: 101) или путем иммунизации модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариативные области тяжелой и каппа легкой цепи иммуноглобулина человека, антигеном BCMA человека.

После иммунизации спленоциты собирали у каждой мыши и либо

(1) сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и формирования кле-

ток гибридомы, и скринировали на специфичность ВСМА; либо

(2) отсортировывали В-лимфоциты (как описано в US 2007/0280945A1), с применением фрагмента ВСМА человека в качестве реагента для сортировки, который связывает и идентифицирует реактивные антитела (антиген-положительные В-лимфоциты).

Первоначально были выделены химерные антитела к ВСМА, имеющие переменную область человека и константную область мыши. Антитела были охарактеризованы и отобраны по желательным характеристикам, включая аффинность, селективность и т.д. При необходимости константные области мыши были заменяли желаемой константной областью человека, например константной областью дикого типа или модифицированным IgG1 или IgG4, для создания полностью человеческого антитела анти-ВСМА. В то время как выбранная константная область может варьировать в зависимости от конкретного применения, свойства высокоаффинной антигенсвязывающей и целевой специфичности находятся в переменной области.

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей антител анти-ВСМА.

В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, и CDR выбранных антител анти-ВСМА согласно данному изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в табл. 2.

Таблица 1

Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV	HCDR	HCDR	HCDR	LCV	LCDR	LCDR	LCDR
	R	1	2	3	R	1	2	3
mAb16711	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb16716	18	20	22	24	26	28	30	32
mAb16732	34	36	38	40	42	44	46	48
mAb16747	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb21581	66	68	70	72	74	76	78	80

Таблица 2

Идентификаторы нуклеотидных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV	HCDR	HCDR	HCDR	LCV	LCDR	LCDR	LCDR
	R	1	2	3	R	1	2	3
mAb16711	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb16716	17	19	21	23	25	27	29	31
mAb16732	33	35	37	39	41	43	45	47
mAb16747	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb21581	65	67	69	71	73	75	77	79

Пример 2. Создание ВСМА-специфичных химерных антигенных рецепторов.

Шесть антител анти-ВСМА (mAb16711, mAb16716, mAb16732, mAb16747 и mAb21581) были реформатированы в одноцепочечные переменные фрагменты VL-VH (ScFv) и помещены в конструкцию химерного антигенного рецептора (CAR), в которой применялся шарнирный домен CD8 $\alpha$  и трансмембранный домен, костимулирующий домен 4-1BB и стимулирующий домен CD3 $\zeta$ . ВСМА-специфические CAR клонировали в лентивирусный экспрессионный вектор (Lenti-X™ Bicistronic Expression System (Neo), Clontech Cat #632181), и генерировали лентивирусные частицы с помощью системы Lenti-X Packaging Single-Shot (VSV-G) (Clontech Cat #631276) в соответствии с протоколами производителя. Клетки Jurkat конструировали для экспрессии репортера NFAT-люциферазы (Jurkat/NFATLuc cl. 3C7), затем трансдуцировали различными конструкциями CAR с применением чашек с предварительно нанесенным покрытием RetroNectin® (Clontech, Cat #T110a) в соответствии с протоколами производителя. После отбора в течение по меньшей мере 2 недель из 500 мкг/мл G418 (Gibco, Cat #11811-098), получали следующие клеточные линии: CAR-T; Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16716 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16711 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16732 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16747 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 21581 VL-VH CART. Нуклеотидные последовательности конструкций CAR, применяемые для создания этих линий клеток CAR-T, как проиллюстрировано на чертеже, продемонстрированы в SEQ ID NO: 81 (mAb16711 VL/VH), 83 (mAb16716 VL/VH), 85 (mAb16732 VL/VH), 87 (mAb16747 VL/VH) и 89 (mAb21581 VL/VH). Эти шесть линий клеток CAR-T применяли для оценки экспрессии на клеточной поверхности и активации клеток ВСМА CAR-T,

как описано в примере 3.

Химерные антигенные рецепторы, содержащие анти-BCMA scFv VL-VH, трансмембранный домен huCD8, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3 $\zeta$  конструировали с применением нуклеотидных последовательностей VL и VH двух антител анти-BCMA, mAb21581 и mAb16747 (соответствующих SEQ ID NO: 89 и 87 соответственно). В качестве несвязывающегося контроля, подобный CAR был сконструирован с применением нуклеотидной последовательности нерелевантного scFv (конструкция CAR SEQ ID NO: 91). Эти CAR клонировали в лентивирусный вектор pLVX с промотором EF1a и IRES: последовательность eGFP (для отслеживания CAR-трансдуцированных клеток), и получали лентивирус с псевдотипом VSV.

CD3+T-клетки выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), стимулировали микрогранулами CD3/CD28 плюс 100 ед./мл рекомбинантного IL-2 человека и трансдуцировали лентивирусом при MOI=5. Трансдуцированные клетки размножали в течение 3 недель с микрогранулами CD3/CD28 плюс 100 ед./мл рекомбинантного IL-2 человека перед криоконсервированием до применения в эксперименте *in vivo*. Эти три линии CAR-T-клеток применяли для оценки эффективности снижения опухолевой нагрузки *in vivo*, как описано в примерах 4 и 5.

Пример 3. Экспрессия конструкций BCMA CAR на клеточной поверхности в клетках Jurkat и активация клеток BCMA CAR-T.

Относительную экспрессию конструкций BCMA CAR на клеточной поверхности в клетках Jurkat/NFATLuc оценивали с помощью проточной цитометрии. Для окрашивания, клетки помещали в буфер для окрашивания (PBS, без кальция и магния (Irving 9240) +2% FBS (ATCC 30-2020) при плотности 200000 клеток на лунку в 96-луночном планшете с V-образным дном лунок и окрашивали в течение 30 мин при 4°C с 10 мкг/мл внеклеточного домена BCMA, слитого с hIgG1-Fc (BCMA ecto-hFc), или нерелевантного белка, слитого с hIgG1-Fc (изотипический контроль Fc). После инкубации с изотипическим контролем BCMA-hFc или Fc клетки промывали один раз в буфере для окрашивания и окрашивали вторичным антителом, конъюгированным с Alexa-Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch, Cat #109-606-170) при концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки промывали и фиксировали с применением 50% раствора BD Cytofix (BD, Cat #554655), разбавленного в буфере для окрашивания. Образцы обрабатывали на проточном цитометре Intellicyt iQue и анализировали с помощью FlowJo 10.2 для расчета средней интенсивности флуоресценции (MFI). Отношение сигнал:шум (S:N) определяли путем взятия отношения MFI изотипического контроля BCMA-hFc или Fc к MFI только вторичного антитела.

Активность линий CAR-T оценивали с помощью биоанализа CAR-T/APC (антигенпредставляющие клетки). Для проведения биоанализа 50000 клеток CAR-T добавляли в 96-луночные белые планшеты Thermo-Nunc (Thermo Scientific, Cat #136101) 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. Применяли следующие APC:RAJI, Daudi, RPMI8226 (эндогенно экспрессируют BCMA) и HEK293 (BCMA-отрицательные). Смесь клеток инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, в увлажненном инкубаторе в течение 5 ч. Активность NFAT-люциферазы измеряли с помощью Promega One-Glo (№ по каталогу E6130) и планшет-ридера Perkin Elmer Envision. Относительные люциферазные единицы (RLU) генерировали и наносили на график в GraphPad Prism с помощью четырехпараметрического логистического уравнения по 8-точечной кривой ответа. Условие нулевого APC для каждой кривой доза-ответ также включали в анализ как продолжение трехкратного серийного разведения и представляли как самую низкую дозу.

Активность CAR-T определяли путем взятия отношения наибольшего значения RLU на кривой к наименьшему и представляли как сигнал:шум (S:N) в табл. 4.

Табл. 3 демонстрирует, что 16747 и 21581 CAR-T имели сходную поверхностную экспрессию с показателем S:N в диапазоне 209-273, 16716 CAR-T экспрессировались в 44 раза выше фона, в то время как экспрессия 16732 и 16711 CAR была намного ниже с показателем S:N, составляющим 13 и 4 соответственно.

Табл. 4 демонстрирует, что все шесть линий BCMA CAR-T клеток были активированы клетками RAJI, Daudi и RPMI8226. Никакие линии клеток CAR-T не активировались посредством HEK293. 16747 BCMA CAR характеризовались самой сильной активацией в биоанализе CAR-T/APC, в то время как CAR 16711 имели самую слабую активность, независимо от BCMA, экспрессирующего APC. Наконец, наблюдалась корреляция между экспрессией CAR (табл. 3) и активностью CAR (табл. 4).

Таблица 3

Связывание растворимого FC-BCMA на клеточных линиях BCMA CAR-T

Клеточная линия	S:N (BCMA-hFc)	S:N (Изотип-hFc)
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7	1,5	0,8
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/ <b>16716</b> VL-VH CART	44,0	1,1
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/ <b>16711</b> VL-VH CART	3,7	1,2
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/ <b>16732</b> VL-VH CART	13,1	1,0
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/ <b>16747</b> VL-VH CART	209,2	1,3
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/ <b>21581</b> VL-VH CART	224,5	1,2

Таблица 4

Активация BCMA CAR-T в биоанализе CAR-T/APC

Антигенпредст авляющая клетка	CAR-T Макс. активность					
	Без CAR	<b>16716</b>	<b>16711</b>	<b>16732</b>	<b>16747</b>	<b>21581</b>
RAJI	1,2	16,3	7,9	16,8	38,9	26,9
Daudi	1,0	6,4	2,6	4,9	14,0	8,0
RPMI8226	0,8	6,6	1,8	5,2	12,5	12,3
HEK293	0,9	0,8	0,9	0,8	0,9	0,9

Пример 4. CAR-T-клетки, нацеленные на BCMA, замедляют рост опухолей, экспрессирующих BCMA (OPM-2), в модели ксеногенной опухоли *in vivo*.

Для определения *in vivo* эффективности Т-клеток химерного антигенного рецептора (CAR), нацеленных на BCMA, было проведено исследование ксеногенной опухоли на мышах с применением клеток OPM-2 множественной миеломы человека, которые экспрессируют высокие уровни BCMA.

Имплантиция и измерение ксеногенных опухолей. В день 0 иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>112rg<sup>tm1Wj1</sup>/SzJ (NSG) внутривенно вводили  $2 \times 10^6$  BCMA<sup>+</sup> OPM-2 клеток опухоли множественной миеломы человека, которые были сконструированы так, чтобы также экспрессировать люциферазу светлячка (OPM-2-люциферазные клетки). В день 21 мышам внутривенно вводили  $2 \times 10^6$  Т-клеток, которые экспрессируют либо контрольный CAR, либо анти-BCMA CAR (что определено по частоте клеток, экспрессирующих GFP, который является маркером для тех клеток, которые были трансдуцированы посредством CAR). Мышам (n=5 на группу) вводили  $2 \times 10^6$  нерелевантных scFc CAR Т (контрольный scFv CAR),  $2 \times 10^6$  анти-BCMA CAR Т, кодирующих 21581 scFv CAR, или  $2 \times 10^6$  анти-BCMA CAR Т, кодирующих 16747 scFv. Рост опухоли оценивали до дня 61 путем измерения биолюминесценции опухоли (BLI) у анестезированных животных. В качестве положительного контроля группе мышей (n=5) вводили только OPM-2-люциферазные клетки, но не Т-клетки. С целью измерения фоновых уровней BLI, группа мышей (n=5) не получала лечения, а также не получала опухолевых клеток или Т-клеток.

Измерение роста ксеногенной опухоли. Для измерения опухолевой нагрузки применяли BLI визуализацию. Мышам внутрибрюшинно вводили 150 мг/кг субстрата люциферазы D-люциферина, суспендированного в PBS. Через 5 мин после этой инъекции у мышей осуществляли BLI визуализацию под изофлурановой анестезией с помощью системы Xenogen IVIS. Изображение получали с полем зрения на D, высотой объекта 1,5 см и средним уровнем биннинга с автоматическим временем экспозиции, определяемым программой Living Image Software. Сигналы BLI извлекали с помощью программного обеспечения Living Image: области, представляющие интерес, были очерчены вокруг каждой массы опухоли, и интенсивности фотонов были записаны как p/s/cm<sup>2</sup>/sr.

В то время как BCMA<sup>+</sup> OPM-2-люциферазные опухоли прогрессивно росли у мышей, получавших нерелевантные scFv CAR Т-клетки, CAR Т-клетки, кодирующие 21581 scFv CAR, снижали опухолевую нагрузку до фоновых уровней у большинства животных, а CAR Т-клетки, кодирующие 16747 scFv CAR, снижали опухолевую нагрузку до фоновых уровней у всех животных. Результаты приведены в табл. 5а ниже.

Таблица 5а

Средний размер опухоли (по интенсивности излучения) в различные моменты времени

<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 5 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	6,22E+05 ± 2,77E+04
Без CAR T (положительный контроль)	5,62E+05 ± 2,75E+04
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	5,95E+05 ± 2,40E+04
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	6,07E+05 ± 3,97E+04
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	5,54E+05 ± 2,80E+04
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 11 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	6,90E+05 ± 3,64E+04
Без CAR T (положительный контроль)	6,22E+05 ± 3,34E+04
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	6,80E+05 ± 2,76E+04
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	7,13E+05 ± 2,90E+04
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	6,30E+05 ± 2,42E+04
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 20 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	7,59E+05 ± 5,82E+04
Без CAR T (положительный контроль)	2,32E+06 ± 2,94E+05
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	2,80E+06 ± 5,26E+05
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	3,06E+06 ± 4,42E+05
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	2,53E+06 ± 2,22E+05
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 26 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	5,51E+05 ± 2,51E+04
Без CAR T (положительный контроль)	5,96E+06 ± 8,74E+05
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	8,03E+06 ± 1,41E+06
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	6,76E+06 ± 1,34E+06
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	6,96E+06 ± 3,39E+05



<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 31 день после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	6,62E+05 ± 3,35E+04
Без CAR T (положительный контроль)	1,58E+07 ± 4,84E+06
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,57E+07 ± 3,05E+06
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,44E+07 ± 2,12E+06
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,01E+07 ± 5,46E+05
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 34 дня после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	4,57E+05 ± 1,04E+04
Без CAR T (положительный контроль)	3,36E+07 ± 1,27E+07
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	3,00E+07 ± 2,82E+06
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	2,05E+07 ± 3,56E+06
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	8,31E+06 ± 9,79E+05
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 38 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	6,60E+05 ± 3,13E+04
Без CAR T (положительный контроль)	3,91E+07 ± 6,87E+06
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	4,25E+07 ± 5,08E+06
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	2,19E+07 ± 7,88E+06
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,90E+06 ± 1,20E+06
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 40 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	5,39E+05 ± 9,67E+03
Без CAR T (положительный контроль)	Животные умерщвлены
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	Животные умерщвлены
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,13E+07 ± 4,84E+06
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	8,71E+05 ± 2,80E+05

<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 47 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	7,73E+05 ± 1,91E+04
Без CAR T (положительный контроль)	Животные умерщвлены
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	Животные умерщвлены
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	3,17E+07 ± 3,11E+07
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	8,85E+05 ± 3,72E+04
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 54 дня после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	7,49E+05 ± 1,95E+04
Без CAR T (положительный контроль)	Животные умерщвлены
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	Животные умерщвлены
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	4,34E+07 ± 4,29E+07
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	8,24E+05 ± 5,48E+04
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 61 день после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	6,18E+05 ± 2,77E+04
Без CAR T (положительный контроль)	Животные умерщвлены
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	Животные умерщвлены
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	6,41E+05 ± 4,07E+04
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	5,40E+05 ± 2,93E+04

Дальнейший эксперимент проводили, как описано выше, за исключением того, что мышам внутривенно вводили 2×10<sup>6</sup> T-клеток, которые экспрессируют либо контрольный CAR, либо анти-BCMA CAR в день 22 (а не в день 21), и рост опухоли оценивали до дня 56 (а не до дня 61).

В то время как BCMA<sup>+</sup> OPM-2-люциферазные опухоли прогрессивно росли у мышей, получавших нерелевантные scFv CAR T-клетки, CAR T-клетки, кодирующие 21581 и 16747 scFv CAR, снижали опухолевую нагрузку до фоновых уровней у всех животных. Результаты приведены в табл. 5b ниже.

Таблица 5b

Средний размер опухоли (по интенсивности излучения) в различные моменты времени

<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 14 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	6,72E+05 ± 1,50E+04
Без CAR T (положительный контроль)	7,93E+05 ± 8,18E+04
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	7,09E+05 ± 2,13E+04
анти-BCMA CAR (21581N scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	7,87E+05 ± 1,20E+05
анти-BCMA CAR (16747P scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	8,93E+05 ± 9,05E+04
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 20 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	5,32E+05 ± 3,64E+04
Без CAR T (положительный контроль)	3,07E+06 ± 3,01E+05
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	2,91E+06 ± 2,46E+05
анти-BCMA CAR (21581N scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	2,57E+06 ± 8,27E+05
анти-BCMA CAR (16747P scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	3,13E+06 ± 5,97E+05
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 23 дня после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	5,56E+05 ± 4,29E+04
Без CAR T (положительный контроль)	1,01E+07 ± 1,28E+06
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	8,37E+06 ± 1,38E+06
анти-BCMA CAR (21581N scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,00E+07 ± 3,92E+06
анти-BCMA CAR (16747P scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	8,26E+06 ± 1,59E+06
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 27 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	5,18E+05 ± 2,87E+04
Без CAR T (положительный контроль)	1,67E+07 ± 1,54E+06
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,47E+07 ± 2,36E+06
анти-BCMA CAR (21581N scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,59E+07 ± 6,36E+06
анти-BCMA CAR (16747P scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,03E+07 ± 1,71E+06

<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 30 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	5,18E+05 ± 1,29E+04
Без CAR T (положительный контроль)	1,93E+07 ± 3,10E+06
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	2,03E+07 ± 2,48E+06
анти-BCMA CAR (21581N scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	7,21E+06 ± 1,97E+06
анти-BCMA CAR (16747P scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,16E+07 ± 3,61E+06
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 34 дня после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	5,66E+05 ± 3,76E+04
Без CAR T (положительный контроль)	3,69E+07 ± 6,27E+06
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	4,07E+07 ± 4,13E+06
анти-BCMA CAR (21581N scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	5,74E+05 ± 1,24E+04
анти-BCMA CAR (16747P scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,66E+06 ± 9,09E+05
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 38 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	5,43E+05 ± 3,32E+04
Без CAR T (положительный контроль)	Животные умерщвлены
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	5,87E+07 ± 5,72E+06
анти-BCMA CAR (21581N scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	5,39E+05 ± 1,58E+04
анти-BCMA CAR (16747P scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	5,55E+05 ± 5,02E+04
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 44 дня после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	6,42E+05 ± 3,33E+04
Без CAR T (положительный контроль)	Животные умерщвлены
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	Животные умерщвлены
анти-BCMA CAR (21581N scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	6,68E+05 ± 3,09E+04
анти-BCMA CAR (16747P scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	5,39E+05 ± 2,25E+04

CAR T Лечение	Интенсивность излучения [p/s/cm <sup>2</sup> /sr] через 56 дней после имплантации (среднее ± SEM)
Без опухоли (фоновый BLI)	8,10E+05 ± 5,92E+04
Без CAR T (положительный контроль)	Животные умерщвлены
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	Животные умерщвлены
анти-BCMA CAR (21581N scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	6,37E+05 ± 2,71E+04
анти-BCMA CAR (16747P scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	7,13E+05 ± 4,17E+04

Пример 5. CAR-T-клетки, нацеленные на BCMA, замедляют рост опухолей, экспрессирующих BCMA (MOLP-8), в модели ксеногенной опухоли *in vivo*.

Для определения *in vivo* эффективности Т-клеток химерного антигенного рецептора (CAR), нацеленных на BCMA, было проведено исследование ксеногенной опухоли на мышах с применением клеток множественной миеломы человека MOLP-8, которые экспрессируют низкие уровни BCMA.

Имплантация и измерение ксеногенных опухолей: В День 0 иммунодефицитным мышам NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>112rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) внутривенно вводили 2×10<sup>6</sup> BCMA<sup>+</sup> MOLP-8 опухолевых клеток множественной миеломы человека, которые были сконструированы для экспрессии люциферазы светлячка (MOLP-8-люциферазные клетки). В день 12 мышам внутривенно вводили 2×10<sup>6</sup> Т-клеток, которые экспрессируют либо контрольный CAR, либо анти-BCMA CAR (что определяли по частоте клеток, экспрессирующих GFP, который является маркером для тех клеток, которые были трансдуцированы посредством CAR). Мышам (n=5 на группу) вводили 2×10<sup>6</sup> нерелевантных scFv CAR Т (контрольный scFv CAR), 2×10<sup>6</sup> анти-BCMA CAR Т, кодирующих 21581 scFv CAR, или 2×10<sup>6</sup> анти-BCMA CAR Т, кодирующих 16747 scFv. Рост опухоли оценивали на протяжении всего эксперимента путем измерения биолюминесценции опухоли (BLI) у анестезированных животных. В качестве положительного контроля группе мышей (n=5) вводили только MOLP-8-люциферазные клетки, но не Т-клетки. С целью измерения фоновых уровней BLI, группа мышей (n=5) не получала лечения, а также не получала опухолевых клеток или Т-клеток.

Измерение роста ксеногенной опухоли. Для измерения опухолевой нагрузки применяли BLI визуализацию. Мышам внутрибрюшинно вводили 150 мг/кг субстрата люциферазы, D-люциферина, суспендированного в PBS. Через 5 мин после этой инъекции у мышей осуществляли BLI визуализацию под изофлурановой анестезией с помощью системы Xenogen IVIS. Изображение получали с полем зрения на D, высотой объекта 1,5 см и средним уровнем биннинга с автоматическим временем экспозиции, определяемым программой Living Image Software. Сигналы BLI извлекали с помощью программного обеспечения Living Image: области, представляющие интерес, были очерчены вокруг каждой массы опухоли, и интенсивности фотонов были записаны как p/s/cm<sup>2</sup>/sr.

В то время как BCMA<sup>+</sup> MOLP-8-люциферазные опухоли прогрессивно росли у мышей, получавших нерелевантные scFv CAR Т-клетки, CAR Т-клетки, кодирующие 21581 scFv CAR и 16747 scFv CAR, снижали опухолевую нагрузку до фоновых уровней у всех животных. Результаты показаны в табл. 6 ниже.

Таблица 6

Средний размер опухоли (по интенсивности излучения) в различные моменты времени

CAR T Лечение	Интенсивность излучения [p/s/cm <sup>2</sup> /sr] через 12 дней после имплантации (среднее ± SEM)
Без опухоли (фоновый BLI)	6,81E+05 ± 3,46E+04
Без CAR T (положительный контроль)	1,51E+06 ± 7,81E+04
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,72E+06 ± 1,33E+05
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,46E+06 ± 1,01E+05
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	1,32E+06 ± 5,86E+04

<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 18 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	7,61E+05 ± 2,73E+04
Без CAR T (положительный контроль)	2,01E+07 ± 8,14E+05
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	2,11E+07 ± 3,02E+06
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	5,37E+06 ± 9,01E+05
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	6,98E+06 ± 9,57E+05
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 25 дней после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	7,20E+05 ± 2,31E+04
Без CAR T (положительный контроль)	5,93E+07 ± 7,71E+06
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	6,40E+07 ± 1,71E+07
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	7,50E+05 ± 4,63E+04
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	6,77E+05 ± 7,41E+04
<b>CAR T Лечение</b>	<b>Интенсивность излучения [p/s/cm<sup>2</sup>/sr] через 32 дня после имплантации (среднее ± SEM)</b>
Без опухоли (фоновый BLI)	6,85E+05 ± 3,99E+04
Без CAR T (положительный контроль)	Животные умерщвлены
Контрольный CAR T (нерелевантный scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	Животные умерщвлены
анти-BCMA CAR (21581 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	6,28E+05 ± 3,75E+04
Анти-BCMA CAR (16747 scFv) 2 × 10 <sup>6</sup> клеток	6,82E+05 ± 2,35E+04

Пример 6. BCMA-специфические клетки CAR-T опосредуют цитолиз BCMA-экспрессирующих клеток. CD3+ T-клетки выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), стимулировали микрогранулами CD3/CD28 плюс 100 ед./мл рекомбинантного IL-2 человека и трансдуцировали лентивирусом при MOI=5, как описано выше в примере 2. Трансдуцированные клетки размножали в течение 3 недель с микрогранулами CD3/CD28 плюс 100 ед./мл рекомбинантного IL-2 человека перед постановкой цитолитического анализа.

Для определения цитолитической способности T-клеток химерного антигенного рецептора (CAR), нацеленных на BCMA, проводили цитолитический анализ с применением размноженных CAR-T-клеток и различных линий опухолевых клеток-мишеней, которые экспрессируют различные уровни BCMA. На день 21 размножения, размноженные клетки CAR-T совместно культивировали в трех повторностях в различных соотношениях с линиями клеток-мишеней BCMA+, меченных кальцеином. Каждую линию клеток-мишеней собирали и ресуспендировали при плотности 2×10<sup>6</sup>/мл перед добавлением красителя кальцеин-AM в концентрации 8 мкМ в течение 35 мин при 37°C. После мечения кальцеином клетки-мишени дважды промывали для удаления лишнего кальцеина. Затем T-клетки и клетки-мишени совместно культивировали на 96-луночном планшете с круглым дном лунок при различных соотношениях и культивировали при 37°C в течение 2,5 ч, когда собирали культуральный супернатант. В качестве отрицательного контроля клетки-мишени культивировали совместно с T-клетками, полученными с применением аналогичного CAR, разработанного для содержания нерелевантного scFv, не распознающего BCMA. В качестве дополнительного отрицательного контроля CAR применяли нетрансдуцированные и размноженные T-клетки от того же нормального здорового донора. В качестве контроля для опосредованного антиген-специфическими CAR-T-клетками уничтожения применяли линию клеток-мишеней хронического миелолейкоза K562, поскольку эта линия клеток является отрицательной по экспрессии BCMA. С целью определения того, высвобождается ли кальцеин спонтанно из линий клеток-мишеней

H-929 и MOLF-8, каждую линию клеток культивировали в отсутствие клеток CAR-T. Для определения максимально возможного высвобождения кальцеина, линии клеток-мишеней культивировали и лизировали с применением среды Optimizer, которая была дополнена 1% детергентом Triton™ X-114. В супернатанте относительные уровни кальцеина измеряли с помощью планшет-ридера Viktor X4, а процент цитотоксичности рассчитывали как

$$\left( \frac{\text{сигнал кальцеина-спонтанное высвобождение кальцеина}}{\text{максимальное высвобождение кальцеина-спонтанное высвобождение кальцеина}} \right) \times 100$$

Как продемонстрировано в табл. 7А-7С ниже, культуры, состоящие из ВСМА-нацеленных CAR+ Т-клеток, генерированных с применением scFv 21581 и 16747, индуцировали устойчивый цитолит клеток-мишеней H-929 и клеток-мишеней MOLF-8.

По сравнению с клетками H-929, в отношении клеток MOLF8 наблюдался более низкий уровень цитотоксичности. Этот результат объясняется тем, что H-929 экспрессирует более высокие уровни антигена ВСМА, чем клетки MOLF-8. Для каждой культуры клеток CAR-T, нацеленных на ВСМА, наибольшая степень цитотоксичности наблюдалась в отношении клеток H-929, а клетки CAR-T, нацеленные на ВСМА, сконструированные с применением 16747 scFv, продемонстрировали наибольшую степень цитотоксичности в отношении обеих линий клеток-мишеней. Как нетрансдуцированные, так и размноженные (MOI 0) Т-клетки, а также нерелевантные CAR-Т-клетки (17363) при совместном культивировании с клетками-мишенями при максимальном соотношении 50 Т-клеток к одной клетке-мишени не смогли индуцировать какой-либо цитолит клеток-мишеней MOLF-8 и H-929. Этот результат демонстрирует, что цитолит наблюдается только тогда, когда структура CAR содержит scFv, распознающий ВСМА (например, из mAb21581 и mAb16747). Кроме того, клетки CAR-T, нацеленные на ВСМА, продемонстрировали незначительную цитотоксичность в отношении клеток K562, у которых отсутствует экспрессия ВСМА, что указывает на то, что экспрессия ВСМА необходима для цитолиза.

Таблица 7А

ВСМА-направленный цитолит, осуществляемый CAR-Т-клетками

Соотношение «Т эффектор:клетка- мишень»	CAR-Т-клетка/клетка-мишень							
	21581/MOLF8		21581/H929		16747/MOLF8		16747/H929	
	среднее	SD	среднее	SD	среднее	SD	среднее	SD
50	9,1	2,0	22,3	0,7	14,0	1,5	29,3	1,8
25	3,7	0,8	10,0	0,9	10,9	2,0	19,4	3,4
12,5	1,6	0,6	3,9	1,4	8,2	0,9	9,3	3,2
6,25	0,6	0,5	1,7	0,7	5,8	1,3	4,2	2,6
3,13	-1,5	0,3	0,0	1,1	2,2	0,9	2,9	2,4
1,56	0,3	0,5	-0,9	2,4	0,2	0,7	1,8	2,3
0,78	-1,3	2,2	-0,7	0,5	-2,9	0,5	0,9	1,7

SD: стандартное отклонение.

Таблица 7В

ВСМА-направленный цитолит, осуществляемый CAR-Т-клетками

Соотношение «Т эффектор:клетка- мишень»	CAR-Т-клетка/клетка-мишень							
	17363 HPV16/MOLF 8		17363 HPV16/H929		21581/K562		16747/K562	
	среднее	SD	среднее	SD	среднее	SD	среднее	SD
50	-3,1	1,7	-0,8	1,2	2,0	1,1	3,5	1,4

SD: стандартное отклонение.

Таблица 7С

ВСМА-направленный цитолит, осуществляемый CAR-Т-клетками

Соотношение «Т эффектор:клетка- мишень»	CAR-Т-клетка/клетка-мишень			
	CAR отриц Т- клетки/MOLF8		CAR отриц Т-клетки/H929	
	среднее	SD	среднее	SD
50	-1,4	2,0	-0,5	1,5

SD: стандартное отклонение.

Пример 7. Цитотоксичность *ex vivo* CAR-T-клеток, нацеленных на ВСМА, в костном мозге пациента с множественной миеломой.

CD3+ T-клетки выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), стимулировали микрогранулами CD3/CD28 плюс 100 ед./мл рекомбинантного IL-2 человека и трансдуцировали лентивирусом при MOI=5, как описано выше в примере 2. Трансдуцированные клетки размножали в течение 3 недель с микрогранулами CD3/CD28 плюс 100 ед./мл рекомбинантного IL-2 человека перед постановкой цитолитического анализа.

При сборе размноженные клетки CAR-T промывали и ресуспендировали в полной среде (RPMI с добавлением 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 292 мкг/мл L-глутамина). Костный мозг от пациентов с множественной миеломой размораживали и ресуспендировали в полной среде. Стромальные клетки HS-5 высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном лунок по 10000 клеток на лунку и инкубировали в течение ночи. T-клетки и костный мозг пациента добавляли в лунки, содержащие строму, при различных соотношениях E:T (2-кратное титрование, начиная с E:T=10:1) и культивировали при 37°C в течение 12 ч. В качестве отрицательного контроля CAR применяли нетрансдуцированные и размноженные T-клетки от того же нормального здорового донора.

Через 12 ч выживаемость бластов множественной миеломы определяли с помощью проточной цитометрии. Клетки окрашивали смесью антител, конъюгированных с флуорофором (анти-CD4, анти-CD8, анти-CD16, анти-CD45, анти-CD90, анти-CD138 и анти-SlamF7) в буфере BD Horizon Brilliant Stain Buffer в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали один раз в PBS и окрашивали с применением восстановимого красителя мертвых клеток LIVE/DEAD (LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain) в течение 20-30 мин при 4°C с последующими двумя промывками в PBS и ресуспендировали в холодном буфере Miltenyi AutoMac. К образцам добавляли гранулы CountBright для количественного определения абсолютного количества клеток на лунку. Образцы анализировали на проточном цитометре BD FortessaX20. Выжившие бласты множественной миеломы гейтировались как живые одиночные CD4-/CD8-/SlamF7+/CD138+. Процент выживаемости рассчитывали как абсолютное количество живых бластов множественной миеломы в обработанном образце, нормализованное по отношению к живым клеткам множественной миеломы в необработанном контроле.

Культуры, состоящие из ВСМА-нацеленных CAR+ T-клеток, генерированных с применением mAb21581 VH/VL, индуцировали устойчивый целевой специфический цитолиз бластов множественной миеломы от 2 пациентов с впервые диагностированной миеломой и 1 пациента с рецидивом. При соотношении E:T, составляющем 10:1, лизировалось 87-94% бластов множественной миеломы. Нетрансдуцированные и размноженные (MOI 0) T-клетки лизировали 34-0% бластов множественной миеломы. Этот результат демонстрирует способность нацеленных на ВСМА CAR+ T-клеток эффективно лизировать бласты множественной миеломы, полученные от пациента, специфическим для мишени образом. Результаты приведены в табл. 8 ниже.

Таблица 8

Процент (%) выживаемости бластов множественной миеломы при ВСМА-направленном цитолизе, осуществляемом CAR-T-клетками

ID образца	MM453		MM511		MM455	
Статус заболевания	впервые диагностированное		впервые диагностированное		рецидив	
% MM бластов	25%		38%		90%	
ВСМА ABC на MM	12302		2631		46925	
соотношение «T-клетка:клетка-мишень»	ВСМА CAR-T	контроль ьн. T	ВСМА CAR-T	контроль ьн. T	ВСМА CAR-T	контроль ьн. T
10	7	66	11	85	13	156
5	15	66	19	91	32	155
2,5	23	90	28	82	81	148
1,25	49	77	37	92	81	104
0,625	82	92	56	92	98	112
0,312	108	92	100	100	98	102

Данное изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно различные модификации изобретения в дополне-



ние к описанным в данном документе станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания. Предполагается, что такие модификации подпадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный антигенный рецептор, специфичный к антигену созревания В-клеток (BCMA), содержащий от N-конца к С-концу

- (а) внеклеточный лигандсвязывающий домен, содержащий антигенсвязывающий домен анти-BCMA;
- (б) шарнир из CD8;
- (с) трансмембранный домен из CD8; и
- (d) цитоплазматический домен, содержащий костимулирующий домен из 4-1BB и сигнальный домен из CD3zeta,

причем внеклеточный лигандсвязывающий домен представляет собой домен одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv) анти-BCMA, содержащий варибельную область легкой цепи (LCVR) и варибельную область тяжелой цепи (HCVR), соединенные линкером,

причем LCVR содержит домены LCDR1-LCDR2-LCDR3, приведенные в SEQ ID NO: 60-62-64 соответственно и HCVR содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3, приведенные в SEQ ID NO: 52-54-56 соответственно.

2. Химерный антигенный рецептор по п.1, где линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 93-96.

3. Химерный антигенный рецептор по п.1 или 2, где LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 и HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

4. Химерный антигенный рецептор по любому из пп.1-3, где

- (а) шарнир содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97;
- (b) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98;
- (с) костимулирующий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; или
- (d) сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100.

5. Химерный антигенный рецептор по п.1, где химерный антигенный рецептор содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88.

6. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор по любому из пп.1-5.

7. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.6, где молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 87.

8. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.6 или 7.

9. Вектор по п.8, где вектор представляет собой ДНК-вектор, РНК-вектор, плазмиду, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или ретровирусный вектор.

10. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.6 или 7 или вектор по п.8 или 9.

11. Клетка по п.10, которая представляет собой Т-клетку человека.

12. Сконструированная клетка, содержащая химерный антигенный рецептор по любому из пп.1-5.

13. Сконструированная клетка по п.12, где

- (а) сконструированная клетка представляет собой иммунную клетку;
- (b) сконструированная клетка представляет собой иммунную клетку и иммунная клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку;
- (с) сконструированная клетка представляет собой Т-лимфоцит; или
- (d) сконструированная клетка представляет собой Т-лимфоцит и Т-лимфоцит представляет собой вспомогательный Т-лимфоцит, цитотоксический Т-лимфоцит, регуляторный Т-лимфоцит или Т-лимфоцит-хелпер.

14. Сконструированная клетка по п.13, представляющая собой CD8+ цитотоксический Т-лимфоцит.

15. Популяция сконструированных клеток, которая может быть получена путем

- (а) получения популяции иммунных клеток, полученных от субъекта;
- (b) введения в иммунные клетки молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор по любому из пп.1-5;
- (с) культивирования иммунных клеток в условиях экспрессии молекул нуклеиновой кислоты; и
- (d) выделения иммунных клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор на поверхности клеток.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая одно из следующего:

(а) генетически модифицированная Т-клетка человека и фармацевтически приемлемый носитель, где генетически модифицированная Т-клетка человека содержит химерный антигенный рецептор по любому из пп.1-5; или

(b) сконструированная клетка по п.12 и фармацевтически приемлемый носитель; или

(с) сконструированная клетка по п.13 и фармацевтически приемлемый носитель; или

(d) сконструированная клетка по п.14 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Применение сконструированной клетки по п.13 или 14 или популяции сконструированных клеток по п.15 в получении лекарственного средства для лечения ВСМА-экспрессирующего рака у субъекта путем обеспечения противоопухолевого иммунитета у субъекта, где клетки предназначены для введения в терапевтически эффективном количестве для

(a) повышения активности Т-лимфоцитов у принимающего субъекта; или

(b) стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа на популяцию клеток-мишеней или ткань у принимающего субъекта.

18. Применение по п.17, где субъектом является человек.

19. Применение по п.17 или 18, где рак, экспрессирующий ВСМА, представляет собой множественную миелому, острый лимфобластный лейкоз В-клеточной линии, хронический В-клеточный лимфолейкоз, В-клеточную неходжкинскую лимфому, лейкоз и лимфому, острый лимфобластный лейкоз, лимфому Ходжкина или острый лимфобластный лейкоз у детей.

20. Способ конструирования популяции клеток для экспрессии химерного антигенного рецептора, включающий

(a) получение популяции иммунных клеток;

(b) введение в иммунные клетки молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор по любому из пп.1-5;

(c) культивирование иммунных клеток в условиях экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты; и

(d) выделение иммунных клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор на поверхности клеток.

21. Способ по п.20, дополнительно включающий получение популяции иммунных клеток от субъекта.

