



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **130798** (13) **C2**

(51) МПК (2026.01)

C07K 19/00

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2021 02541	(72) Винахідник(и):	Фан Сяоху (CA), Чоу Чуан-Чу (US), Чжуанг Цючуань (CN), Ван Пінгуань (CN), Ван Лінь (CN), Ян Лей (CN), Хао Цзяін (CN)
(22) Дата подання заявки:	10.08.2016	(73) Володілець (володільці):	ЛЕДЖЕНД БАЙОТЕК АЙРЛЕНД ЛІМІТЕД, One Spencer Dock, North Wall Quay, Dublin 1, Ireland (IE)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	21.05.2026	(74) Представник:	Петров Андрій Володимирович
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	201510490002.8, 201510733585.2	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2013/123061 A1, 22.08.2013 WO 2016/014789 A2, 28.01.2016
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	11.08.2015, 02.11.2015		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	CN, CN		
(41) Публікація відомостей про заявку:	15.09.2021, Бюл.№ 37		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	20.05.2026, Бюл.№ 20		
(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21):	, а201802367, 10.08.2016		

(54) ХИМЕРНІ РЕЦЕПТОРИ АНТИГЕНІВ НА ОСНОВІ ОДНОДОМЕННИХ АНТИТІЛ І СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Даний винахід стосується однодоменного антитіла (sdAb), спрямованого проти В-клітинного антигену дозрівання (BCMA), що містить області, які визначають комплементарність (CDR) 1, CDR2 і CDR3, де CDR1 містить SEQ ID NO: 16, CDR2 містить SEQ ID NO: 27, і CDR3 містить SEQ ID NO: 38. Також винахід стосується химерного рецептора антигенів (CAR), що містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, що містить таке анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранний домен; та (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен.

UA 130798 C2

ПЕРЕХРЕСНІ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕННІ ЗАЯВКИ

Ця заявка запитує пріоритет за заявкою на патент Китаю № CN201510490002.8, що подана 11 серпня 2015 року, і заявкою на патент Китаю № CN201510733585.2, що подана 2 листопада 2015 року, зміст яких включено в даний опис шляхом посилання в повному обсязі.

5 ПОДАННЯ ПЕРЕЛІКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМУ ФАЙЛІ ASCII

Зміст наступного документа в текстовому файлі ASCII включено в даний опис за допомогою посилання в повному обсязі: машиночитана форма (CRF) переліку послідовностей (ім'я файлу: 761422000340SEQLISTING.txt, дата запису: 9 серпня 2016 року, розмір: 355 КБ).

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

10 Цей винахід належить до однодоменних антитіл, химерних антигенних рецепторів, сконструйованих імунними ефекторними клітинами і способам їх застосування. Винахід також відноситься до активації і розмноження клітин для терапевтичного застосування, особливо для Т-клітинної імунотерапії на основі химерних антигенних рецепторів.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

15 В даний час з розвитком імунотерапії пухлин і медичних технологій Т-клітинна імунотерапія на основі химерних антигенних рецепторів (CAR-T) є одним з найбільш перспективних напрямків в імунотерапії пухлин. Як правило, химерний рецептор антигенів (CAR) включає позаклітинний антигензв'язуючий домен, трансмембранний домен і внутрішньоклітинний сигнальний домен. Позаклітинний антигензв'язуючий домен може містити одноланцюговий варіабельний фрагмент (scFv), націлений на ідентифікований пухлинний антиген. CAR можуть
20 бути експресовані на поверхні Т-клітин за допомогою методів генного трансфікування. При зв'язуванні з пухлинним антигеном-мішенню CAR можуть активувати Т-клітини для запуску специфічної протипухлинної відповіді антиген-залежним чином, не обмежуючись наявністю основних комплексів гістосумісності (МНС), специфічних для пухлинного антигену-мішені.

25 Однодоменні антитіла (sdAb) відрізняються від звичайних 4-ланцюгових антитіл наявністю одного варіабельного домену мономерного антитіла. Наприклад, представники сімейства верблюжих і акули продукують однодоменні антитіла, що називаються антитілами тільки з важким ланцюгом (HcAb), які за своєю природою не мають легких ланцюгів. Антигензв'язуючий фрагмент в кожному плечі антитіла тільки з важким ланцюгом у представників сімейства верблюжих має один варіабельний домен важкого ланцюга (V_HH), який може характеризуватися високою афінністю до антигену без сприяння легкого ланцюга. V_HH у представників сімейства верблюжих відомий як найменший функціональний антигензв'язуючий фрагмент з молекулярною масою приблизно 15 кД.

30 Описи всіх публікацій, патентів, заявок на патент і опублікованих патентних заявок, згаданих у даному документі, включені в цей документ шляхом посилання в повному обсязі.

КОРОТКИЙ ОПИС СУТІ ВИНАХОДУ

В даному винаході запропоновані однодоменні антитіла, химерні рецептори антигенів (CAR) на основі однодоменних антитіл (таких як V_HH-фрагменти), сконструйовані імунні ефекторні клітини і способи їх застосування при імунотерапії раку.

40 В одному аспекті даного винаходу пропонується анти-CD19 sdAb, що містить CDR-області SEQ ID NO: 76. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76.

45 У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-CD19 тільки з важким ланцюгом (HcAb) або антигензв'язуючий білок, що містить будь-яке з описаних вище анти-CD19 sdAb.

50 В одному аспекті даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів CD19, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD19 sdAb (таке як будь-яке з описаних вище анти-CD19 sdAb); (б) трансмембранний домен; і (с) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є моновалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є полівалентним (наприклад, двовалентним або
55 тривалентним). У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є мультиспецифічним (наприклад, біспецифічним).

В одному аспекті даного винаходу пропонується анти-CD20 sdAb, що містить CDR-області SEQ ID NO: 77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6. У
60

деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb містить домен V_HH , що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-CD20 тільки з важким ланцюгом (HCAB) або антигензв'язуючий білок, що містить будь-яке з описаних вище анти-CD20 sdAb.

В одному аспекті даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів CD20, що містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD20 sdAb (таке як будь-яке з описаних вище анти-CD20 sdAb); (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є моновалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є полівалентним (наприклад, двовалентним або тривалентним). У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є мультиспецифічним (наприклад, біспецифічним).

В одному аспекті даного винаходу пропонується анти-BCMA sdAb, що містить CDR-області будь-якої однієї з SEQ ID NO: 78-88. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb містить одну з наведених нижче областей:

(1) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;

(2) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30;

(3) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31;

(4) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 32;

(5) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33;

(6) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34;

(7) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35;

(8) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36;

(9) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37;

(10) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38; або

(11) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb містить домен V_HH , що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 78-88.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-BCMA тільки з важким ланцюгом (HCAB) або антигензв'язуючий білок, що містить будь-яке з описаних вище анти-BCMA sdAb.

В одному аспекті даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів BCMA, що містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-BCMA sdAb (таке як будь-яке з описаних вище анти-BCMA sdAb); (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є моновалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є полівалентним (наприклад, двовалентним

або тривалентним). У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є мультиспецифічним (наприклад, біспецифічним).

В одному аспекті даного винаходу пропонується анти-CD38 sdAb, що містить CDR-області будь-якої однієї з SEQ ID NO: 89-100. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD38 sdAb містить одну з наведених нижче областей:

(1) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 64;

(2) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65;

(3) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66;

(4) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 43; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67;

(5) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68;

(6) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 45; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 57; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 69;

(7) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 58; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70;

(8) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 59; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 71;

(9) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 60; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 72;

(10) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 61; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 73;

(11) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 62; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 74; або

(12) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 63; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD38 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 89-100.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-BCMA тільки з важким ланцюгом (HCAB) або антигензв'язуючий білок, що містить будь-яке з описаних вище анти-BCMA sdAb.

В одному аспекті даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів CD38, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD38 sdAb (таке як будь-яке з описаних вище анти-CD38 sdAb); (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є моновалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є полівалентним (наприклад, двовалентним або тривалентним). У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є мультиспецифічним (наприклад, біспецифічним).

В одному аспекті даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів CD22, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD22 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є моновалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є

полівалентним (наприклад, двовалентним або тривалентним). У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є мультиспецифічним (наприклад, біспецифічним).

В одному аспекті даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів (CAR), що містить поліпептид, який містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше одноклононе антитіло (sdAb), що специфічно зв'язується з першим антигеном, і друге одноклононе антитіло (sdAb), що специфічно зв'язується з другим антигеном; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb розташоване на N-кінці другого sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb розташоване на C-кінці другого sdAb.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу згідно з будь-яким з CAR, описаним вище, перший антиген і другий антиген вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 і гліколіпіду F77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb є анти-BCMA sdAb, таке як будь-яке одне з BCMA sdAb, описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR містить позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить щонайменше дві копії (наприклад, 2, 3 і більше копій) анти-BCMA sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb є анти-CD19 sdAb, таке як будь-яке з описаних вище анти-CD19 sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb є анти-CD20 sdAb, таке як будь-яке з описаних вище анти-CD20 sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb є анти-CD38 sdAb, таке як будь-яке з описаних вище анти-CD38 sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR містить позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить щонайменше дві копії (наприклад, 2, 3 і більше копій) анти-CD38 sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb є анти-CD22 sdAb.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу згідно з будь-яким з CAR, описаним вище, перший антиген відрізняється від другого антигену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є мультиспецифічним, наприклад, біспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb є анти-BCMA sdAb, а друге sdAb є анти-CD38 sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb є анти-BCMA sdAb, а друге sdAb є анти-CD19 sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb є анти-CD19 sdAb, а друге sdAb є анти-CD20 sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb є анти-CD19 sdAb, а друге sdAb є анти-CD22 sdAb.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу згідно з будь-яким з моноспецифічних CAR, описаних вище, перший антиген є таким же, як другий антиген. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є двовалентним або тривалентним. У деяких варіантах здійснення перше sdAb і друге sdAb специфічно зв'язуються з одним і тим же епітопом. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb є таким же, як друге sdAb. У деяких варіантах здійснення перше sdAb і друге sdAb специфічно зв'язуються з різними епітопами.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу згідно з будь-яким з CAR, описаним вище, перше sdAb і/або друге sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим антитілом.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу згідно з будь-яким з CAR, описаним вище, перше sdAb і друге sdAb є безпосередньо злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb і друге sdAb є злитими одне з одним за допомогою пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 144-151.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу згідно з будь-яким з CAR (включаючи CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR і CD22 CAR), описаним вище, трансмембранний домен є похідним від молекули, вибраної з групи, що складається з CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен є похідним від CD8 або CD28. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 132 або SEQ ID NO: 133.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу згідно з будь-яким з CAR (включаючи CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR і CD22 CAR), описаним вище, внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такий як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 140 або SEQ ID NO: 141.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу згідно з будь-яким з CAR (включаючи CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR і CD22 CAR), описаним вище, внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен містить цитоплазматичний домен CD28 і/або цитоплазматичний домен CD137. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 136 і/або SEQ ID NO: 137.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу згідно з будь-яким з CAR (включаючи CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR і CD22 CAR), описаним вище, CAR додатково містить шарнірний домен, розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінців трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен є похідним від CD8α. У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 130.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR додатково містить сигнальний пептид, розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сигнальний пептид є похідним від молекули, вибраної з групи, що складається з CD8α, ГМКСФ-рецептора α і важкого ланцюга IgG1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сигнальний пептид є похідним від CD8α. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сигнальний пептид містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 127.

В одному аспекті даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів будь-якого з перерахованих в Таблицях 4, 5 і 6 елемента. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 152-174, 198-201, 206-216, 248-249, 257-260 і 265-270.

В одному аспекті даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 76-100, 152-174, 198-201, 206-216, 248-249, 257-260 і 265-270.

В одному аспекті даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує будь-який з CAR (включаючи CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR і CD22 CAR), описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу послідовність нуклеїнової кислоти вибирають з групи, що складається з SEQ ID NO: 175-197, 202-205, 217-227, 250-251, 261-264 і 271-276. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота додатково містить послідовність другої нуклеїнової кислоти, що кодує другий CAR, при цьому послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує CAR, функціонально зв'язана з послідовністю другої нуклеїнової кислоти за допомогою послідовності третьої нуклеїнової кислоти, що кодує саморозщеплюваний пептид, такий як пептид T2A, P2A або F2A. У деяких варіантах здійснення даного винаходу послідовність третьої нуклеїнової кислоти є SEQ ID NO: 256В деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є молекулою ДНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є молекулою РНК.

В одному аспекті даного винаходу пропонується вектор, що містить будь-яку з виділених нуклеїнових кислот, описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є експресійним вектором. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є вірусним вектором. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є лентівірусним вектором.

В одному аспекті даного винаходу пропонується сконструйована імунна ефекторна клітина, яка містить будь-який з CAR (включаючи CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR і CD22 CAR), описаних вище, або будь-яку з виділених нуклеїнових кислот, описаних вище, або будь-який з описаних вище векторів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина містить або експресує дві або більшу кількість CAR (включаючи CD19 CAR, CD20 CAR, BCMA CAR, CD38 CAR і CD22 CARs), описаних вище, при цьому два або більша кількість CAR специфічно зв'язуються з різними антигенами. У деяких варіантах здійснення даного винаходу імунна ефекторна клітина є Т-клітиною, НК-клітиною, мононуклеарною клітиною периферичної крові (МПКК), гемопоетичною стовбуровою клітиною, плюрипотентною стовбуровою клітиною або ембріональною стовбуровою клітиною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу імунна ефекторна клітина є Т-клітиною.

В одному аспекті даного винаходу пропонується фармацевтична композиція, що містить будь-яку з сконструйованих імунних ефекторних клітин, описаних вище, і фармацевтично прийнятний носій. Додатково пропонується спосіб лікування раку у індивідуума, що включає

введення індивідууму ефективної кількості будь-якої з фармацевтичних композицій, описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є гемобластозом. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є множинною мієломою, гострим лімфобластним лейкозом або хронічним лімфоцитарним лейкозом. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є солідним раком, таким як гліобластома.

В одному аспекті даного винаходу пропонується фармацевтична композиція, що містить будь-яке з анти-CD19 sdAb, анти-CD20 sdAb, анти-CD38 sdAb або анти-BCMA sdAb, описаних вище, і фармацевтично прийнятний носій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування захворювання (такого як рак) у індивідуума, що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції.

Також пропонуються способи застосування, набори і готові вироби, що містять будь-які однодоменні антитіла, CAR, сконструйовані імунні ефекторні клітини, виділені нуклеїнові кислоти або вектори, що описані вище.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

На Фіг. 1A наведено порівняння структури CAR на основі V_{HH} і звичайного CAR на основі scFv. Схематична структура зліва демонструє типовий моноспецифічний моновалентний CAR, що має позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить домен V_{HH} . Схематична структура справа демонструє типовий моноспецифічний моновалентний CAR, що має позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить домен scFv.

На Фіг. 1B наведено порівняння структури CAR на основі V_{HH} , що має дві антигензв'язуючі ділянки, і звичайного CAR на основі scFv, що має дві антигензв'язуючі ділянки. Схематична структура зліва демонструє типовий CAR, що має позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить два домени V_{HH} . Два домени V_{HH} можуть бути однаковими або різними. Схематична структура справа демонструє типовий CAR, що має позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить домен scFv. Два домени scFv можуть бути однаковими або різними.

На Фіг. 1C проілюстровані схематичні структури типових двовалентних і біспецифічних CAR на основі V_{HH} . Схематична структура на верхній лівій панелі ілюструє типовий моноспецифічний двовалентний CAR, що має позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить два ідентичних домени V_{HH} , кожен з яких специфічно зв'язується з епітопом 1 антигену А. схематична структура на верхній правій панелі ілюструє типовий моноспецифічний двовалентний CAR, що має позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перший домен V_{HH} , що специфічно зв'язується з епітопом 1 антигену А, і другий домен V_{HH} , що специфічно зв'язується з епітопом 2 антигену А. Епітоп 1 і епітоп 2 антигену А можуть відрізнятися за своєю структурою і/або послідовностями. Схематична структура в нижній лівій панелі ілюструє типовий біспецифічний CAR, що має позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перший домен V_{HH} , який специфічно зв'язується з антигеном А, і другий домен V_{HH} , який специфічно зв'язується з антигеном В. Антиген А і антиген В є різними антигенами.

На Фіг. 1D проілюстровані схематичні структури типових CAR на основі V_{HH} , що мають три або більшу кількість доменів V_{HH} . CAR можуть мати безліч доменів V_{HH} , злитих один з одним безпосередньо або за допомогою пептидних лінкерів. Домени V_{HH} можуть бути однаковими або різними. Різні домени V_{HH} можуть специфічно зв'язуватися з різними епітопами на одному і тому ж антигені або на різних антигенах.

На Фіг. 1E проілюстровані типові сконструйовані імунні ефекторні клітини, що спів-експресують два різних CAR на основі V_{HH} . Типові сконструйовані імунні ефекторні клітини на лівій панелі спів-експресують два різних моноспецифічних одновалентних CAR.

Типові сконструйовані імунні ефекторні клітини на середній панелі спів-експресують моноспецифічний, моновалентний CAR і біспецифічний або двовалентний CAR. Типові сконструйовані імунні ефекторні клітини на правій панелі спів-експресують два різних біспецифічних або двовалентних CAR. CAR можуть розпізнавати різні антигени.

На Фіг. 2A наведені результати аналізу цитотоксичності Т-клітин *in vitro*, що експресують типові моноспецифічні CAR, що містять різні антитіла анти-BCMA (тобто, анти-CD269) або анти-CD38 однодоменні антитіла проти клітинної лінії множинної мієломи RPMI8226.Luc.

На Фіг. 2B наведені результати аналізу цитотоксичності Т-клітин *in vitro*, що експресують типові моноспецифічні CAR, що містять різні антитіла анти-BCMA (тобто, анти-CD269) або анти-CD38 однодоменні антитіла проти клітинної лінії гліобластоми U87MG.Luc.

На Фіг. 3A наведені результати аналізу цитотоксичності Т-клітин *in vitro*, що експресують типові біспецифічні CAR проти клітинної лінії множинної мієломи RPMI8226.Luc.

На Фіг. 3В наведені результати аналізу цитотоксичності Т-клітин *in vitro*, що експресують типові біспецифічні CAR проти клітинної лінії множинної мієломи RPMI8226.Luc.

На Фіг. 4 наведені результати аналізу цитотоксичності Т-клітин *in vitro*, що експресують типові біспецифічні CAR проти клітинної лінії множинної мієломи RPMI8226.Luc.

5 На Фіг. 5 проілюстровані конструкції типового біспецифічного CAR, націленого на CD19 і CD20, типового моноспецифічного CAR, націленого на CD19, і типового моноспецифічного CAR, націленого на CD20.

10 На Фіг. 6 наведені результати аналізу цитотоксичності різних Т-клітин *in vitro*. На верхній лівій панелі наведені результати нетрансдукованих контрольних Т-клітин. На верхній правій панелі наведені результати Т-клітин, що експресують типовий CD19 CAR. На нижній лівій панелі наведені результати Т-клітин, що експресують типовий CD20 CAR. На нижній правій панелі наведені результати Т-клітин, що експресують типовий біспецифічний CD19 × CD20 CAR.

На Фіг. 7 наведені результати протипухлинного аналізу Т-клітин *in vivo*, що експресують типовий біспецифічний CAR, націлений на CD19 і CD20.

15 На Фіг. 8А наведені результати аналізу цитотоксичності Т-клітин *in vitro*, що експресують типові моноспецифічні двовалентні CAR проти клітинної лінії множинної мієломи RPMI8226.Luc. Кожен CAR містить позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить два різних анти-BCMA (тобто, анти-CD269) sdAb.

20 На Фіг. 8В наведені результати аналізу цитотоксичності Т-клітин *in vitro*, що експресують типові моноспецифічні двовалентні CAR проти клітинної лінії гліобластоми U87MG.Luc. Кожен CAR містить позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить два різних анти-BCMA (тобто, анти-CD269) sdAb.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС СУТІ ВИНАХОДУ

25 У даному винаході пропонуються моноспецифічним, мультиспецифічні (такі як біспецифічні) і полівалентні (такі як двовалентні або тривалентні) химерні рецептори антигенів, що містять односторонні антитіла (sdAb) на основі позаклітинних антигензв'язуючих доменів. На відміну від антигензв'язуючих фрагментів, похідних від звичайних чотириланцюгових антитіл, sdAb містять тільки один варіабельний домен, такий як V_HH. Таким чином, sdAbs мають набагато менший розмір, ніж антигензв'язуючі фрагменти, такі як scFvs, які в даний час застосовуються як
30 позаклітинні антигензв'язуючі домени в CAR. Крім того, оскільки немає необхідності в спарюванні важкого ланцюга і легкого ланцюга при фолдингу sdAb, порушення фолдингу позаклітинного антигензв'язуючого домену можна зменшити в сконструйованих імунних клітинах, що експресують CAR на основі sdAb. CAR з позаклітинними антигензв'язуючими домонами, що містять множинні копії sdAb або множинні sdAb, націлені на різні епітопи або антигени, можна успішно сконструювати і одержати рекомбінантним шляхом, тим самим
35 забезпечуючи ефективну платформу для підготовки і скринінгу полівалентних і мультиспецифічних CAR. Крім того, невеликий розмір sdAb може забезпечити доступ CAR до прихованих антигенів-мішеней і епітопів в пухлинних тканинах.

Мультиспецифічні і полівалентні CAR можуть характеризуватися більш високою
40 ефективністю в порівнянні з моноспецифічними одновалентними CAR при імунотерапії раку. Ракові клітини є генетично нестабільними, що дозволяє їм уникати націленого на них впливу шляхом мутації або втрати генів, що кодують антигени-мішені. В результаті націлювання на два або більшу кількість різних епітопів або антигенів на ракових клітинах полівалентні або мультиспецифічні CAR можуть зробити більш важким повноцінне ухилення ракових клітин від
45 націленого на них впливу за допомогою сконструйованих імунних ефекторних клітин (таких як Т-клітини), що експресують CAR. Через їх невеликий розмір, тандемно-злиті односторонні антитіла, які застосовуються як позаклітинні антигензв'язуючі домени в полівалентних або мультиспецифічних CAR за даним винаходом, можуть зберігати свою індивідуальну структурну цілісність і зв'язування з антигенами-мішенями, тим самим забезпечуючи ефективне
50 націлювання CAR на кожен епітоп або антиген. Сконструйовані імунні ефекторні клітини, які експресують полівалентні або мультиспецифічні CAR або такі, що спів-експресують два або більшу кількість химерних антигенних рецепторів, які націлені на різні пухлинні антигени, можуть долати механізми ухилення пухлини від імунної відповіді, які зумовлені порушеннями в білково-антигенному процесингу і презентації.

55 Відповідно, в одному аспекті даного винаходу пропонується мультиспецифічний (наприклад, біспецифічний) химерний рецептор антигенів (CAR), що містить поліпептид, який містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше одностороннє антитіло (sdAb), яке специфічно зв'язується з першим антигеном, і друге одностороннє антитіло (sdAb), яке специфічно зв'язується з другим антигеном; (b) трансмембранний домен; і (c)
60 внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому перший антиген відрізняється від другого

антигену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перший антиген є BCMA, а другий антиген є CD38. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перший антиген є CD19, а другий антиген є BCMA. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перший антиген є CD19, а другий антиген є CD20. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перший антиген є CD19, а другий антиген є CD22.

В іншому аспекті пропонується полівалентний химерний рецептор антигенів (CAR), що містить поліпептид, який містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить множину однодоменних антитіл (sdAb), що специфічно зв'язуються з антигеном; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен.

В іншому аспекті пропонується полівалентний химерний рецептор антигенів (CAR), що містить поліпептид, який містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше однодоменне антитіло, яке специфічно зв'язується з першим епітопом антигену, і друге однодоменне антитіло, яке специфічно зв'язується з другим епітопом антигену; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому перший епітоп відрізняється від другого епітопу.

Крім того, пропонуються нові анти-CD19, анти-CD20, анти-BCMA і анти-CD38 однодоменні антитіла і химерні рецептори антигенів, що містять будь-яке з sdAb.

Також в даному документі описані сконструйовані імунні ефекторні клітини (такі як Т-клітини), що містять CAR, фармацевтичні композиції, набори, готові вироби та способи лікування раку із застосуванням сконструйованих імунних ефекторних клітин або однодоменних антитіл.

I. Визначення

Якщо спеціально не вказано інше, при практичній реалізації даного винаходу будуть застосовуватися загальноприйняті методи вірусології, імунології, мікробіології, молекулярної біології і технології рекомбінантних ДНК, відомі фахівцям в даній галузі техніки, багато з яких описані нижче в ілюстративних цілях. Такі технології детально описані в літературі. Див., наприклад, *Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, N. Y. (2009); Ausubel et al, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Maniatis et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984) та інші подібні посилання.

Термін "антитіло" включає моноклональні антитіла (включаючи повнорозмірні 4-ланцюгові антитіла або повнорозмірні антитіла тільки з важким ланцюгом, які мають Fc-область імуноглобуліну), композиції антитіл з поліепітопічною специфічністю, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла, діатіла і одноланцюгові молекули), а також фрагменти антитіл (наприклад, Fab, F (ab')₂ і Fv). В даному контексті термін "імуноглобулін" (Ig) застосовується як взаємозамінний з терміном "антитіло". Антитіла, що розглядаються в даному документі, включають в себе однодоменні антитіла, такі як антитіла тільки з важким ланцюгом.

Основною одиницею 4-ланцюгового антитіла є гетеротетрамерний глікопротеїн, що складається з двох ідентичних легких (L) ланцюгів і двох ідентичних важких (H) ланцюгів. Антитіло IgM складається з 5 основних гетеротетрамерних одиниць разом з додатковим поліпептидом, що називається J-ланцюгом, і містить 10 антигензв'язуючих ділянок, тоді як антитіла IgA складаються з 2-5 основних 4-ланцюгових одиниць, які можуть полімеризуватися з утворенням полівалентних комплексів в комбінації з J-ланцюгом. У разі IgG 4-ланцюгова одиниця зазвичай має масу приблизно 150000 дальтон. Кожний L-ланцюг пов'язаний з H-ланцюгом за допомогою одного ковалентного дисульфідного зв'язку, тоді як два H-ланцюга пов'язані один з одним за допомогою одного або більшої кількості дисульфідних зв'язків в залежності від ізо типу H-ланцюга. Кожний H- і L-ланцюг також має розташовані з рівними інтервалами міжланцюгові дисульфідні містки. На N-кінці кожен H-ланцюг має варіабельний домен (V_H), за яким слідує три константних домени (C_H) для кожного α- і γ-ланцюга і чотири C_H-домени для μ- і ε-ізо типів. На N-кінці кожен L-ланцюг має варіабельний домен (V_L), за яким слідує константний домен на його іншому кінці. V_L вирівнюється з V_H, а C_L вирівнюється з першим константним доменом важкого ланцюга (C_{H1}). Передбачається, що конкретні амінокислотні залишки утворюють область взаємодії між варіабельними доменами легкого і важкого ланцюга. Парування V_H і V_L разом утворює антигензв'язуючу ділянку. Стосовно структури і властивостей різних класів антитіл, див., наприклад, *Basic and Clinical Immunology*, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk,

Сопн., 1994, стор. 71 і глава 6. L-ланцюг, одержаний від будь-якого виду хребетних можна віднести до одного з двох чітко розрізняваних типів, що називаються каппа і лямбда, на основі амінокислотних послідовностей їх константних доменів. В залежності від амінокислотної послідовності константного домену своїх важких ланцюгів (C_H), імуноглобуліни можна віднести до різних класів або ізотипів. Існує п'ять класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, що мають важкі ланцюги, позначені відповідно α , δ , ϵ , γ і μ . Класи γ і α додатково поділяються на підкласи на основі відносно незначних відмінностей в послідовності C_H і функціонування, наприклад, організм людини експресує наступні підкласи: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2.

Термін "антитіло тільки з важким ланцюгом" або "HCAb" відноситься до функціонального антитіла, яке містить важкі ланцюги, але не містить легких ланцюгів, які зазвичай зустрічаються в 4-ланцюгових антитілах. Відомо, що тварини сімейства верблюжих (наприклад, верблюди, ламы або альпаки) продукують HCAb.

Термін "однодоменне антитіло" або "sdAb" відноситься до поліпептиду, що зв'язує один антиген і має три області, які визначають комплементарність (CDR). Антитіло sdAb саме здатне зв'язуватися з антигеном без спарювання з відповідним CDR-вмісним поліпептидом. У деяких випадках однодоменні антитіла сконструйовані з верблюжих антитіл HCAb, а їх варіабельні домени важкого ланцюга згадуються в даному документі як "V_HH". Деякі V_HH також можуть бути відомі як нанотіла. Верблюже sdAb є одним з найменших відомих антигензв'язуючих фрагментів антитіл (див., наприклад, Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-8 (1993); Greenberg et al., Nature 374: 168-73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh et al., Nanomedicine (Lond), 8: 1013-26 (2013)). Основний V_HH має наступну структуру від N-кінця до C-кінця: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, в якому FR1-FR4 відносяться до каркасних областей з 1 по 4, і в якому CDR1-CDR3 відносяться до областей 1-3, що визначають компліментарність.

"Виділеним" антитілом є таке антитіло, яке було ідентифіковано, виділено і/або вилучено з компонента його продукуючого середовища (наприклад, природне або рекомбінантне). Переважно, виділений поліпептид не пов'язаний з будь-якими іншими компонентами з його продукуючого середовища. Контамінуючі компоненти його продукуючого середовища, такі як рекомбінантні трансфіковані клітини, є речовинами, які, як правило, перешкоджають дослідженню, діагностичному або терапевтичному застосуванню антитіл і можуть включати в себе ферменти, гормони і інші білкові або небілкові розчинені речовини. У переважних варіантах здійснення даного винаходу поліпептид буде очищений: (1) більш ніж на 95 % мас. антитіла, наприклад, за методикою Лоурі, а в деяких варіантах здійснення – більш ніж на 99 % мас.; (1) до ступеня, що є достатнім для одержання щонайменше 15 залишків N-кінцевої або внутрішньої амінокислотної послідовності за допомогою секвенатора з обертовим стаканом, або (3) до одержання гомогенності за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ у відновлювальних або невідновлювальних умовах із застосуванням, наприклад, барвника Кумасі синього або срібного. Виділене антитіло включає антитіло *in situ* в рекомбінантних клітинах, оскільки щонайменше один з компонентів природного середовища антитіла відсутній. У той же час, виділений поліпептид або антитіло, як правило, одержують із застосуванням щонайменше одного етапу очищення.

Термін "варіабельна область" або "варіабельний домен" антитіла відноситься до N-кінцевих доменів важкого або легкого ланцюга антитіла. Варіабельні домени важкого ланцюга і легкого ланцюга можуть бути позначені як "V_H" і "V_L", відповідно. Як правило, ці домени є найбільш варіабельними частинами антитіла (відносно інших антитіл того ж класу) і містять антигензв'язуючі ділянки. Антитіла тільки з важким ланцюгом, одержані від представників видів верблюжих, мають одну варіабельну область важкого ланцюга, яка позначається як "V_HH". Таким чином, V_HH є особливим типом V_H.

Термін "варіабельний" відноситься до того факту, що серед антитіл деякі сегменти варіабельних доменів сильно розрізняються за послідовностями. V-домен опосередковує антигенне зв'язування і визначає специфічність конкретного антитіла до його конкретного антигену. У той же час варіабельність не є рівномірно розподіленою по всьому діапазону варіабельних доменів. Навпаки, варіабельність зосереджена в трьох сегментах варіабельних доменів як легкого, так і важкого ланцюга, що називаються гіперваріабельними областями (HVR). Більш консервативні фрагменти варіабельних доменів називаються каркасними областями (FR). Кожен варіабельний домен природних легких і важких ланцюгів містить чотири FR-області, що переважно приймають конфігурацію бета-листа і з'єднані трьома HVR, що утворюють петлі, які з'єднують структури бета-типу, а в деяких випадках – є їх частиною. HVR кожного ланцюга об'єднані один з одним в безпосередній приблизності за допомогою FR-областей і, разом з HVR іншого ланцюга, беруть участь в утворенні антигензв'язуючої ділянки антитіла (див. Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of

Health, Bethesda, Md. (1991)). Константні домени не беруть безпосередньої участі у зв'язуванні антитіла з антигеном, однак виявляють різні ефекторні функції, наприклад, участь антитіла в антитілозалежній клітинній токсичності.

У даному контексті термін "моноклональне антитіло" відноситься до антитіла, одержаного з популяції по суті однорідних антитіл, тобто, з популяції, окремі антитіла в якій є ідентичними, за винятком можливих природних мутацій і/або посттрансляційних модифікацій (наприклад, ізомеризації, амідування), які можуть бути присутніми в незначних кількостях. Моноклональні антитіла є високоспецифічними, спрямованими на одну антигенну ділянку. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які зазвичай включають в себе різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло спрямовано на одну детермінанту антигену. Крім своєї специфічності, перевага препаратів моноклональних антитіл полягає в тому, що вони синтезовані гібридомною культурою або рекомбінантно і не контаміновані іншими імуноглобулінами. Модифікатор "моноклональне" вказує на властивість антитіла, як на одержане по суті з однорідної популяції антитіл, при цьому значення цього модифікатора не слід інтерпретувати як необхідність продукування антитіла за допомогою будь-якого конкретного способу. Наприклад, моноклональні антитіла, які будуть застосовуватися згідно із даним винаходом, можна одержати за допомогою різних способів, включаючи гібридомну технологію (наприклад, Kohler і Milstein., *Nature*, 256: 495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, NY, 1981)), технологію рекомбінантних ДНК (див., наприклад, в патенті США № 4816567), технологію фагових дисплеїв (див., наприклад, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338 (2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004); і Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284 (1-2): (2004) і технологію продукування антитіл людини або аналогів антитіл людини в організмах тварин, які частково або повністю містять локуси або гени імуноглобулінів людини, які кодуєть послідовності імуноглобулінів людини (див., наприклад, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7: 33 (1993); в патенті США № 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; і 5661016; Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); і Lonberg і Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Термін "голе антитіло" відноситься до антитіла, яка не кон'юговане з цитотоксичним фрагментом або радіоактивною міткою.

Терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" або "ціле антитіло" в даному документі є взаємозамінними і відносяться до антитіла по суті в його інтактній формі, на відміну від фрагмента антитіла. Зокрема, повнорозмірні 4-ланцюгові антитіла включають в себе такі антитіла, які мають важкий і легкий ланцюг, включаючи Fc-область. Повнорозмірні антитіла тільки з важким ланцюгом включають в себе важкий ланцюг (такий як V_HH) і Fc-область. Константні домени можуть бути константними доменами нативних послідовностей (наприклад, константні домени нативних послідовностей людини) або їх варіантами амінокислотних послідовностей. У деяких випадках інтактне антитіло може мати одну або декілька ефекторних функцій.

"Фрагмент антитіла" містить частину інтактного антитіла, переважно антигензв'язуючу і/або варіабельний ділянку інтактного антитіла. Приклади фрагментів антитіл включають в себе Fab-, Fab'-, F(ab')₂ і Fv-фрагменти; діатіла; лінійні антитіла (див. в патенті США № 5641870, Приклад 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8 (10): 1057-1062 [1995]); молекули одностанцюгових антитіл; одностанцюгові антитіла (такі як V_HH) і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл. При розщепленні антитіл папаїном утворюються два ідентичних антигензв'язуючих фрагмента, що називаються "Fab"-фрагменти, і залишковий "Fc"-фрагмент, назва якого відображає його здатність легко кристалізуватися. Fab-фрагмент складається з цілого L-ланцюга разом з доменом варіабельної області H-ланцюга (V_H), і першим константним доменом з одного важкого ланцюга (C_H1). Кожен Fab-фрагмент є моновалентним відносно зв'язування антигену, тобто, він має одну антигензв'язуючу ділянку. Обробка антитіла пепсином дозволяє одержати один великий F(ab')₂-фрагмент, який умовно відповідає двом дисульфіднозв'язаним Fab-фрагментам, які мають різну антигензв'язуючу активність і як і раніше здатні до перехресного зв'язування антигену. Fab'-фрагменти відрізняються від Fab-фрагментів тим, що мають декілька додаткових залишків на карбоксильному кінці домену C_H1, що включає в себе один або більшу кількість

цистеїну з шарнірної ділянки антитіла. В даному описі Fab'-SH є позначенням Fab', в якому цистеїновий(и) залишок(и) константних доменів несе вільну тіольну групу. F(ab')₂-фрагменти антитіла первинно одержували у вигляді пар Fab'-фрагментів, між якими знаходяться шарнірні залишки цистеїну. Відомі також інші варіанти хімічного зв'язування фрагментів антитіл.

5 Fc-фрагмент містить карбокситермінальні частини обох H-ланцюгів, що утримуються разом дисульфідними зв'язками. Ефекторні функції антитіл визначаються за послідовностями в Fc-області; ця область також є областю, яка розпізнається Fc-рецепторами (FcR), виявленими на визначених типах клітин.

10 "Fv" є мінімальним фрагментом антитіла, що містить повну антигенрозпізнавальну і антигензв'язуючу ділянку. Цей фрагмент складається з димеру одного домену варіабельної області важкого ланцюга і одного домену варіабельної області легкого ланцюга, що сполучені жорстким нековалентним зв'язком. В результаті фолдингу цих двох доменів виділяється шість гіперваріабельних петель (по 3 петлі з кожного H- і L-ланцюга), які забезпечують наявність амінокислотних залишків для зв'язування антигенів і надають антитілу антигензв'язуючу специфічність. У той же час навіть один варіабельний домен (або половина Fv, що містить тільки три HVR, специфічних по відношенню до антигену) має здатність розпізнавати і зв'язувати антиген, хоча і з більш низькою афінністю, ніж повна ділянка зв'язування.

20 "Одноланцюгові Fv", які також мають абревіатуру "sFv" або "scFv", є фрагментами антитіл, які містять домени антитіл V_H і V_L, зв'язані в один поліпептидний ланцюг. Переважно, поліпептид scFv додатково містить поліпептидний лінкер між доменами V_H і V_L, які дають можливість scFv утворювати необхідну структуру для зв'язування антигенів. Для огляду sFv, див. публікацію Pluckthun в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

25 "Функціональні фрагменти" описаних в даному документі антитіл містять частину інтактного антитіла, що зазвичай включає антигензв'язуючу або варіабельну область інтактного антитіла або Fc-область антитіла, яка зберігає або модифікує можливість зв'язуватися FcR. приклади фрагментів антитіл включають в себе лінійні антитіла, молекули одноланцюгових антитіл і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

30 Термін "діатіла" відноситься до малих фрагментів антитіл, одержаних в результаті конструювання sFv-фрагментів (див. попередній параграф) з короткими лінкерами (приблизно 5-10 залишків) між доменами V_H і V_L, з метою забезпечення спарювання

35 V-доменів між ланцюгами, але не всередині ланцюгів, в результаті чого утворюється двовалентний фрагмент, тобто, фрагмент, що має дві антигензв'язуючі ділянки. Біспецифічні антитіла є гетеродимерами двох "кросоверних" sFv-фрагментів, в яких домени V_H і V_L двох антитіл представлені на різних поліпептидних ланцюгах. Діатілаописани більш детально, наприклад, в EP 404097; WO 93/11161; Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

40 Моноклональні антитіла в даному документі зокрема включають в себе "химерні" антитіла (імуноглобуліни), в яких частина важкого і/або легкого ланцюга ідентична або гомологічна до відповідних послідовностей антитіл конкретного виду тварин або антитіл, що належать до конкретного класу або підкласу, в той час як інша частина ланцюга(ів) ідентична або гомологічна до відповідних послідовностей антитіл іншого виду тварин або антитіл, що належать до іншого класу або підкласу, а також фрагменти таких антитіл, за умови, що вони виявляють бажану біологічну активність (описано в патенті США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Химерні антитіла, що представляють інтерес, включають в себе антитіла PRIMATTZFD®, в яких антигензв'язуюча область антитіла походить від антитіл, одержаних, наприклад, шляхом імунізації мавп макак антигеном, що представляє інтерес. В даному контексті термін "гуманізоване антитіло" застосовується для позначення підмножини "химерних антитіл".

50 "Гуманізовані" форми антитіл нелюдського походження (наприклад, верблюда) представляють собою химерні антитіла, що містять мінімальні послідовності, які є похідними від імуноглобуліну нелюдського походження. У деяких варіантах здійснення даного винаходу гуманізованим антитілом є імуноглобулін людини (реципієнтне антитіло), в якому залишки з HVR реципієнта (описані далі) замінюють залишками з HVR видів нелюдського походження (донорське антитіло), наприклад, миші, щура, кролика або нелюдиноподібного примата, при цьому антитіло володіє бажаною специфічністю, афінністю і/або активністю. У деяких випадках каркасні ("FR") залишки імуноглобуліну людини замінюють відповідними залишками нелюдського походження. Крім того, гуманізовані антитіла можуть містити залишки, що відсутні в реципієнтному антитілі або в донорському антитілі. Ці модифікації можна здійснити для подальшого уточнення характеристик антитіл, таких як афінність зв'язування. Як правило,

гуманізоване антитіло містить по суті всі або щонайменше один, а зазвичай два варіабельних домени, в яких всі або по суті всі гіперваріабельні петлі відповідають гіперваріабельним петлям послідовності імуноглобуліну нелюдського походження, і все або по суті всі FR-області є такими областями, які відносяться до послідовності імуноглобуліну людини, проте FR-області можуть включати в себе одну або декілька заміни окремих FR-залишків, що покращує характеристики антитіл, такі як афінність зв'язування, ізомеризація, імуногенність і т.п. Кількість цих амінокислотних заміни в FR зазвичай не перевищує 6 в Н-ланцюзі, а в L-ланцюзі – не більше 3. У деяких випадках гуманізоване антитіло також може містити щонайменше частину константної області імуноглобуліну (Fc), як правило, імуноглобуліну людини. Для одержання додаткової інформації див., наприклад, Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); і Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992). Крім того, див., наприклад, Vaswani і Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1: 105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035-1038 (1995); Hurler і Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5: 428-433 (1994); і в патенті США №№ 6982321 і 7087409.

"Антитіло людини" є антитілом, що має амінокислотну послідовність, яка відповідає послідовності антитіла, продукованого в організмі людини і/або одержаного за допомогою будь-якої методики одержання антитіл людини, описаних в даному документі. Це визначення антитіла людини, зокрема, не включає гуманізоване антитіло, що містить антигензв'язуючі залишки нелюдського походження. Антитіла людини можна одержати за допомогою різних методик, відомих в даній галузі техніки, включаючи бібліотеки фагового дисплея. Hoogenboom і Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991). Також для одержання моноклональних антитіл людини доступні способи, описані в Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95 (1991). Див. Також van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Антитіла людини можна одержати шляхом введення антигену в організм трансгенної тварини, модифікованого з метою продукування таких антитіл у відповідь на антигенну стимуляцію, при цьому ендogenous локуси зазначеної тварини відключені, наприклад, імунізованих ксеномишей (див., наприклад, в патенті США №№ 6075181 і 6150584 щодо технології XENOMOUSE™). Див. також, наприклад, Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3557-3562 (2006) відносно антитіл людини, одержаних за допомогою технології В-клітинної гібридомії людини.

У даному контексті термін "Гіперваріативна область", "HVR" або "HV" відноситься до областей варіабельного домену антитіла, які характеризуються гіперваріабельністю послідовностей і/або утворюють структурно визначені петлі. Як правило, однодоменні антитіла містять три HVR (або CDR): HVR1 (або CDR1), HVR2 (або CDR2) і HVR3 (або CDR3). HVR3 відображає найбільшу різноманітність трьох HVR і, як вважають, відіграє унікальну роль в додаванні тонкої специфічності антитіл. Див., наприклад, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363: 446-448 (1993); Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3: 733-736 (1996).

Термін "область, яка визначає компліментарність" або "CDR" застосовується для позначення гіперваріабельних областей, визначених системою Kabat. Див. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).

Існує ряд визначень HVR, охоплених даною заявкою. Області, які визначають компліментарність (CDR) за Kabat, основані на варіабельності послідовностей і є найбільш часто вживаними (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Замість цього, Chothia звертає увагу на локалізацію структурних петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). AbV HVR представляють собою компроміс між CDR за Kabat і структурними петлями за Chothia і застосовуються в програмному забезпеченні для моделювання антитіл AbM від Oxford Molecular. "Контактні" HVR основані на аналізі доступних складних кристалічних структур. Залишки з кожної з цих HVR відзначені нижче в Таблиці 1.

Таблиця 1.

Визначення HVR.

Петля	Kabat	AbM	Chothia	Контакт
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Нумерація за Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Нумерація за Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

HVR можуть містити "розширені HVR", представлені нижче: 24-36 або 24-34 (L1), 46-56 або 50-56 (L2) і 89-97 або 89-96 (L3) в VL і 26-35 (H1), 50-65 або 49-65 (H2), і 93-102, 94-102 або 95-102 (H3) в VH. Для кожного з цих визначень залишки в варіабельних доменах нумеруються за Kabat et al., вище.

Амінокислотні залишки однодоменного антитіла (такі як VH) нумеруються згідно із загальною нумерацією для доменів VH за Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, Md., Publication No. 91), стосовно доменів VH від представників сімейства верблюжих в статті Riechmann і Muyldermans, J. Immunol. Methods 2000 Jun. 23; 240 (1-2): 185-195. Згідно із цією нумерацією FR1 VH містить амінокислотні залишки в положеннях 1-30, CDR1 VH містить амінокислотні залишки в положеннях 31-35, FR2 VH містить амінокислотні залишки в положеннях 36-49, CDR2 VH містить амінокислотні залишки в положеннях 50-65, FR3 VH містить амінокислотні залишки в положеннях 66-94, CDR3 VH містить амінокислотні залишки в положеннях 95-102 і FR4 VH містить амінокислотні залишки в положеннях 103-113. В цьому відношенні слід відзначити, що, як добре відомо в даній галузі техніки для доменів VL і для доменів VH, загальна кількість амінокислотних залишків в кожній з CDR може варіюватися і може не відповідати загальній кількості амінокислотних залишків, позначених згідно із нумерацією Kabat (тобто, одне або декілька положень згідно з нумерацією Kabat не обов'язково можуть бути зайняті в конкретній послідовності, або конкретна послідовність може містити більше амінокислотних залишків, ніж кількість, допустима нумерацією Kabat).

Вирази "нумерація залишків варіабельного домену за Kabat" або "нумерація положень амінокислот за Kabat" і їх варіанти відносяться до системи нумерації, яка застосовується для варіабельних доменів важкого або легкого ланцюга згідно з поданням про антитіла в публікації Kabat et al., вище. При застосуванні цієї системи нумерації конкретна лінійна амінокислотна послідовність може містити меншу кількість амінокислот або додаткові амінокислоти, відповідні укорочення або вставки в FR або HVR варіабельного домену. Наприклад, варіабельний домен важкого ланцюга може містити вставку однієї амінокислоти (залишок 52A згідно з Kabat) після залишку 52 в H2 і вставлені залишки (наприклад, залишки 82A, 82b і 82c і т.д., згідно з Kabat) після залишку 82 FR важкого ланцюга. Нумерацію залишків за Kabat можна визначити для даного антитіла шляхом вирівнювання областей гомології послідовності антитіла зі "стандартною" послідовністю, пронумерованою за Kabat.

Якщо не вказано інше, нумерація залишків в важкого ланцюга імуноглобуліну відповідає нумерації індексу ЕС згідно з Kabat et al., вище. "Індекс EU згідно з Kabat" відноситься до нумерації залишків антитіла IgG1 EU людини.

"Каркасні" або "FR" -залишки представляють собою залишки варіабельного домену, які не є залишками HVR, згідно з визначенням в даному документі.

"Людський консенсусний каркас" або "людський акцепторний каркас" є структурою, яка представляє собою амінокислотні залишки, які найбільш часто зустрічаються у відборі каркасних послідовностей VL або VH імуноглобуліну людини. Зазвичай відбір послідовностей VL або VH імуноглобуліну людини здійснюють з підгрупи послідовностей варіабельного домену. Як правило, підгрупа послідовностей є підгрупою, як описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). У разі VL, приклади включають в себе підгрупу, яка може бути підгрупою каппа I, каппа II,

каппа III або каппа IV, як описано в Kabat et al., вище. Крім того, в разі V_H , підгрупа може бути підгрупою I, підгрупою II або підгрупою III, як описано в Kabat et al. В альтернативному варіанті, людський консенсусний каркас може бути похідним від вищеописаних конкретних залишків, наприклад, коли людський каркасний залишок вибирають на основі його гомології з донорським каркасом шляхом вирівнювання послідовності донорського каркасу з набором різних послідовностей людського каркасу. Акцепторний людський каркас, "похідний від" каркасу імуноглобуліну людини або людського консенсусного каркасу, може мати таку ж амінокислотну послідовність або може містити раніше існуючі зміни в амінокислотній послідовності. У деяких варіантах здійснення даного винаходу кількість існуючих раніше амінокислотних змін становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше, або 2 або менше.

"Амінокислотна модифікація" в заданому положенні, наприклад, Fc-області, відноситься до заміни або делеції зазначеного залишку або вставки щонайменше одного амінокислотного залишку, суміжного з зазначеним залишком. Термін "вставка, суміжна із зазначеним залишком" означає вставку в межах одного-двох залишків. Вставка може бути N-кінцевою або C-кінцевою відносно зазначеного залишку. Бажана модифікація амінокислоти в даному винаході є заміною.

Антитіло "з дозрілою афінністю" є антитілом, яке містить одну або декілька змін в одній або більшій кількості HVR, що призводять до посилення афінності антитіла до антигену в порівнянні з початковим антитілом, що не містить зазначеної(их) змін(и). В одному варіанті здійснення даного винаходу антитіло з дозрілою афінністю характеризується наномольними або навіть пікомольними значеннями афінності до антигену-мішені. Антитіла з дозрілою афінністю можна одержати за допомогою різних методик, відомих в даній галузі техніки. Наприклад, Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) описує дозрівання афінності при і перетасування доменів V_H і V_L . Випадковий мутагенез HVR і/або каркасних залишків описаний, наприклад, в: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154 (7): 3310-9 (1995); і Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

У даному контексті термін "специфічно зв'язується", "специфічно розпізнається" або "специфічний для" відноситься до вимірюваних і відтворених взаємодій, таких як зв'язування між мішенню і антигензв'язуючим білком (таким як CAR або sdAb), що є визначальним для підтвердження факту наявності мішені при наявності гетерогенної популяції молекул, включаючи біологічні молекули. Наприклад, антигензв'язуючий білок (такий як CAR або sdAb), який специфічно зв'язує мішень (яка може бути епітопом), є антигензв'язуючим білком (таким як CAR або sdAb), який зв'язує цю мішень з більшою афінністю, авідністю, легкістю і/або тривалістю, в порівнянні з іншими мішенями. У деяких варіантах здійснення даного винаходу ступінь зв'язування антигензв'язуючого білка (такого як CAR або sdAb) з незв'язаною мішенню становить менш ніж приблизно 10 % зв'язування антигензв'язуючих білка (такого як CAR або sdAb) з вказаною мішенню, що вимірюється, наприклад, за допомогою радіоімунаналізу (RIA). У деяких варіантах здійснення даного винаходу антигензв'язуючий білок (такий як CAR або sdAb), який специфічно зв'язує мішень, має константу дисоціації (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ або $\leq 0,1$ нМ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антигензв'язуючий білок (такий як CAR або sdAb) специфічно зв'язує епітоп на білку, який є консервативним серед білків від різних видів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу специфічне зв'язування може включати в себе, проте не вимагає виняткового зв'язування.

Термін "специфічність" відноситься до селективного розпізнавання антигензв'язуючого білка (такого як CAR або sdAb) для конкретного епітопу антигену. Природні антитіла, наприклад, є моноспецифічними. В даному контексті термін "мультиспецифічний" означає, що антигензв'язуючий білок (такий як CAR або sdAb) має дві або більшу кількість антигензв'язуючих ділянок, з яких щонайменше дві зв'язують інший антиген або інший епітоп того ж антигену. В даному контексті термін "біспецифічний" означає, що антигензв'язуючий білок (такий як CAR або sdAb) характеризується двома різними антигензв'язуючими специфічностями. В даному контексті термін "моноспецифічний" CAR означає антигензв'язуючий білок (такий як CAR або sdAb), який має одну або більшу кількість ділянок зв'язування, кожна з яких зв'язує один і той же епітоп одного і того ж антигену.

У даному контексті термін "валентність" означає наявність визначеної кількості ділянок зв'язування в антигензв'язуючому білку (такому як CAR або sdAb). Природне антитіло, наприклад, або повнорозмірне антитіло, має дві зв'язуючі ділянки і є двовалентним. Таким чином, терміни "тривалентний", "чотиривалентний", "п'ятивалентний" і "шестивалентний" вказують на наявність двох ділянок зв'язування, трьох ділянок зв'язування, чотирьох ділянок

зв'язування, п'яти ділянок зв'язування і шести ділянок зв'язування, відповідно, в антигензв'язуючому білку (наприклад, CAR або sdAb).

"Ефекторні функції антитіла" відносяться до біологічних видів активності, властивим Fc-області (Fc-область з нативною послідовністю або варіант амінокислотної послідовності Fc-області) антитіла, і змінюються в залежності від ізотипу антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають в себе: зв'язування C1q і комплемент-залежну цитотоксичність; зв'язування з рецептором Fc; антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; придушення рецепторів поверхні клітини (наприклад, рецепторів В-клітин); і активацію В-клітин. "Знижена або мінімізована" ефекторна функція антитіла означає, що функція знижена щонайменше на 50 % (в альтернативному варіанті 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %) у порівнянні з антитілом дикого типу або немодифікованим антитілом. Ефекторну функцію антитіла легко може визначити і виміряти фахівець в даній галузі техніки. У переважному варіанті здійснення даного винаходу впливають на ефекторні функції антитіла відносно зв'язування комплементу, функції комплемент-залежної цитотоксичності і антитілозалежної цитотоксичності. У деяких варіантах здійснення даного винаходу ефекторна функція усувається за допомогою мутації в константній області, яка усуває глікозування, наприклад, "мутація без ефектору". В одному аспекті мутація без ефектору є мутацію N297A або DANA (D265A+N297A) в області C_H2. Shields et al., J. Biol. Chem. 276 (9): 6591-6604 (2001). В альтернативному варіанті додаткові мутації, що призводять до зменшення або усунення ефекторної функції, включають в себе: K322A і L234A/L235A (LALA). В альтернативному варіанті ефекторну функцію можна зменшити або усунути за допомогою методів продукування, таких як експресія в клітинах-господарях, яка при відсутності глікозилювання (наприклад, E. coli.) Або в результаті зміненого профілю глікозилювання є неефективним або менш ефективним при підвищенні ефекторної функції (наприклад, Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278 (5): 3466-3473 (2003).

"Антитілозалежна клітинно-опосередкована цитотоксичність" або ADCC відноситься до форми цитотоксичності, при якій Ig, що секретується, зв'язується з Fc-рецепторами (FcR), присутніми на деяких цитотоксичних клітинах (наприклад, клітини природні кілери (NK), нейтрофіли і макрофаги), дозволяючи цим цитотоксичним ефекторним клітинам специфічно зв'язуватися з антигенвмісною клітиною-мішенню і згодом вбивати клітину-мішень цитотоксинів. Антитіла "озброюють" цитотоксичні клітини і необхідні для знищення клітини-мішені за допомогою цього механізму. Первинні клітини для опосередкування ADCC, NK-клітини, експресують тільки FcγRIII, тоді як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Зведена інформація про експресії Fc на гемопоетичних клітинах наведена в Таблиці 3 на сторінці 464 публікації Ravetch і Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). Для оцінки активності ADCC молекули, що представляє інтерес, можна провести аналіз ADCC *in vitro*, такий як описаний в патенті США № 5500362 або 5821337. Як ефекторні клітини в таких аналізах можна застосовувати моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК) і клітини-натуральні кілери (NK). В альтернативному або додатковому варіанті активність ADCC молекули, що представляє інтерес, можна оцінити *in vivo*, наприклад, на моделі тварини, такої як описано в публікації Clynes et al., PNAS USA 95: 652-656 (1998).

У даному контексті термін "Fc-область" застосовується для визначення С-кінцевої області важкого ланцюга імуноглобуліну, включаючи Fc-області нативної послідовності і варіанти Fc-областей. Незважаючи на те, що кордони Fc-області важкого ланцюга імуноглобуліну можуть варіюватися, Fc-область важкого ланцюга IgG людини зазвичай визначається як розтягнута з амінокислотного залишку в положенні Cys226 або з Pro230 у напрямку до її карбоксильного кінця. С-кінцевий лізин (залишок 447 згідно із системою нумерації EU) Fc-області можна видалити, наприклад, під час продукування або очищення антитіла, або за допомогою рекомбінантного конструювання нуклеїнової кислоти, що кодує важкий ланцюг зазначеного антитіла. Відповідно, композиція інтактних антитіл може містити популяції антитіл з видаленими залишками K447, популяції антитіл без видалених залишків K447 і популяції антитіл, що мають суміш антитіл із залишком K447 і без нього. Придатні Fc-області з нативними послідовностями для застосування в антитілах, описаних в даному документі, включають в себе IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B) IgG, IgG3 і IgG4.

Як правило, термін "афінність зв'язування" відноситься до сили суми нековалентних взаємодій між однією ділянкою зв'язування молекули (наприклад, антитіла або CAR) та її партнером по зв'язуванню (наприклад, антигеном). Якщо не вказано інше, в даному документі "афінність зв'язування" відноситься до властивій молекулі афінності зв'язування, що відображає взаємодію між членами пари зв'язуваних компонентів (наприклад, антитілом і антигеном, або CAR і антигеном) при їх співвідношенні 1:1. Афінність молекули X до її партнера Y, як правило,

можна представити у вигляді константи дисоціації (K_d). Афіність можна виміряти за допомогою загальноприйнятих способів, відомих в даній галузі техніки, в тому числі тих, які описані в даному документі. Як правило, низькоафінні антитіла пов'язують антиген повільно і схильні легко дисоціювати, тоді як високоафінні антитіла, як правило, зв'язують антиген швидше і

мають тенденцію залишатися зв'язаними довше. У даній галузі техніки відомі різні способи вимірювання афіності зв'язування, кожний з яких може застосовуватися для цілей даного винаходу. Конкретні ілюстративні і типові варіанти здійснення даного винаходу, пов'язані з вимірюванням афіності зв'язування, описані в даному документі.

"Блокуюче" антитіло або "антагоністичне" антитіло є таким антитілом, яке інгібує або зменшує біологічну активність антигену, з яким воно зв'язується. У деяких варіантах здійснення даного винаходу блокуючі антитіла або антагоністичні антитіла по суті або повністю інгібують біологічну активність антигену.

"Агоністичне" або антитіло, що активує антитіло є таким антитілом, яке підсилює або ініціює передачу сигналу антигеном, з яким воно зв'язується. У деяких варіантах здійснення даного винаходу агоністичні антитіла зумовлюють або активують передачу сигналу без присутності природного ліганду.

"Відсоток (%) ідентичності амінокислотної послідовності" або "гомологію" щодо послідовності пептиду, поліпептиду або антитіла визначають як відсоток амінокислотних залишків послідовності-кандидата, ідентичних амінокислотним залишкам специфічної пептидної або поліпептидної послідовності після вирівнювання послідовностей і введення гелів, якщо це необхідно для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовностей, причому при визначенні ідентичності послідовностей консервативні заміни не враховуються. Вирівнювання амінокислотних послідовностей з метою визначення відсотка їх ідентичності можна здійснити різними способами, відовими фахівцям в даній галузі техніки, наприклад, за допомогою широко доступного програмного забезпечення, такого як програми BLAST, BLAST-2, ALIGN або MEGALIGN™ (DNASTAR). Фахівці в цій галузі техніки можуть визначити відповідні параметри для вимірювання ступеня вирівнювання, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання на повній довжині послідовностей, які підлягають порівнянню.

У даному контексті термін "химерний рецептор антигенів" або "CAR" відноситься до генно-інженерних рецепторів, які можна застосовувати для щеплення однієї або більшої кількості антигенних специфічностей в імунні ефекторні клітини, такі як Т-клітини. Деякі CAR також відомі як "штучні рецептори Т-клітин", "химерні рецептори Т-клітин" або "химерні імунні рецептори". У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR містить позаклітинний антигензв'язуючий домен, специфічний для одного або більшої кількості антигенів (таких як пухлинні антигени), трансмембранний домен і внутрішньоклітинний сигнальний домен Т-клітин і/або інші рецептори. "CAR-T" відноситься до Т-клітини, яка експресує CAR.

"Виділена" молекула нуклеїнової кислоти, що кодує CAR, або sdAb, описані в даному документі, є молекулою нуклеїнової кислоти, яка є ідентифікованою і відділена щонайменше від однієї контамінуючої молекули нуклеїнової кислоти, з якою вона зазвичай зв'язана в середовищі, яке є середовищем її продукування. Переважно, виділена нуклеїнова кислота не зв'язана з усіма компонентами, зв'язаними із середовищем продукування. Виділені молекули нуклеїнової кислоти, що кодують поліпептиди і антитіла, описані в даному документі, перебувають у формі, що відрізняється від форми або компонування, в якій вона зустрічається в природі. Таким чином, виділені молекули нуклеїнової кислоти відрізняються від нуклеїнової кислоти, яка існує в природних умовах в клітинах і кодує поліпептиди і антитіла, описані в даному документі.

Термін "контрольні послідовності" відноситься до послідовностей ДНК, що необхідні для експресії функціонально зв'язаної кодуючої послідовності в конкретному організмі господаря. Контрольні послідовності, які придатні для введення в прокаріоти, наприклад, включають в себе промотор, в деяких випадках операційну послідовність і ділянку зв'язування рибосом. Відомо, що в клітині застосовуються промотори, сигнали поліаденілювання і енхансери.

Нуклеїнова кислота є "функціонально зв'язаною", якщо вона вступає в функціональне взаємовідношення з іншою послідовністю нуклеїнової кислоти. Наприклад, ДНК передпослідовності або секреторного лідера є функціонально зв'язаною з ДНК поліпептиду, якщо вона експресується як пребілок, який бере участь в секреції цього поліпептиду; промотор або енхансер функціонально зв'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію цієї послідовності, або ділянку зв'язування рибосом функціонально зв'язану з кодуючою послідовністю, якщо він розташований так, щоб оптимізувати процес трансляції. В цілому, "функціонально зв'язаний" означає, що послідовності ДНК, будучи зв'язаними, є

безперервними і, в разі наявності секреторного лідера, безперервними і в фазі зчитування. Проте, енхансери не повинні бути безперервними. Зв'язування супроводжується лігуванням по відповідним ділянкам рестрикції. Якщо таких ділянок немає, то згідно із підходящою методикою застосовуються синтетичні олігонуклеотидні адаптори або лінкери.

5 У даному контексті термін "вектор" відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, здатної забезпечувати репродукцію іншої, зв'язаної з нею нуклеїнової кислоти. Термін включає вектор, що знаходиться у вигляді самореplikованої нуклеїнової кислоти, а також вектор, здатний вбудовуватися в геном клітини-господаря, в яку його вводять. Деякі вектори здатні керувати експресією нуклеїнових кислот, з якими вони перебувають у функціональному зв'язку. Такі вектори в даному документі називають "експресуючими векторами".

10 У даному контексті термін "аутологічний" призначений для позначення будь-якого матеріалу, одержаного від того ж індивідуума, якому пізніше цей матеріал буде повторно введений.

Термін "алогенний" відноситься до трансплантату, одержаного від іншого індивідуума того ж виду.

15 У даному контексті термін "трансфікований" або "трансформований", або "трансдукований" відноситься до способу, за допомогою якого екзогенну нуклеїнову кислоту переносять або вводять в клітину-господаря. "Трансфікована" або "трансформована", або "трансдукована" клітина є трансфікованою, трансформованою або трансдукованою екзогенною нуклеїною кислотою. Клітина включає в себе первинну оригінальну клітину та її потомство.

20 У даному контексті вираз "клітина", "лінія клітин" і "культура клітин" застосовуються як взаємозамінні, і всі такі позначення включають в себе потомство. Таким чином, слова "трансфектанти" і "трансфіковані клітини" включають в себе первинну оригінальну клітину і одержані з неї культури, незалежно від кількості пасажів. Також зрозуміло, що все потомство не може бути точно ідентичним за змістом ДНК через навмисні або ненавмисні мутації. В обсяг даного опису входить варіант потомства, одержаний шляхом скринінгу, який володіє такою ж функцією або біологічною активністю, що і первинно трансформована клітина.

25 Терміни "клітина-господар", "лінія клітин-господарів" і "культура клітин-господарів" в даному документі застосовуються як взаємозамінні і відносяться до клітин, в які введена екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство таких клітин. Клітини-господарі включають в себе "трансформанти" і "трансформовані клітини", які включають в себе первинно трансформовані клітини і одержане з них потомство, незалежно від числа пасажів. Потомство може не бути повністю ідентичним батьківській клітині за змістом нуклеїнових кислот і може містити мутації. В обсяг даного опису входить мутантне потомство, одержане шляхом скринінгу або відбору, яке володіє такою ж функцією або біологічною активністю, що і первинно трансформована клітина.

30 У даному контексті термін "лікування" або "вплив" є підходом для одержання корисних або бажаних результатів, що включає в себе клінічні результати. Для цілей даного винаходу корисні або бажані клінічні результати включають в себе один або декілька з наступних явищ, але не обмежуються ними: полегшення одного або більшої кількості симптомів, викликаних захворюванням, зменшення ступеня тяжкості захворювання, стабілізація захворювання (наприклад, запобігання або уповільнення погіршення захворювання), запобігання або уповільнення поширення (наприклад, метастазування) захворювання, запобігання або уповільнення розвитку рецидиву захворювання, уповільнення і затримку прогресування захворювання, зменшення інтенсивності захворювання, досягнення ремісії (часткової або повної) захворювання, зменшення дози одного або більшої кількості інших лікарських засобів, необхідних для лікування захворювання, затримку прогресування захворювання, підвищення якості життя і/або подовження виживання. Термін "лікування" також відноситься до зниження вираженості патологічних наслідків раку. Способи за даним винаходом припускають один або більшу кількість з цих аспектів лікування.

35 У даному контексті термін "індивідуум" або "суб'єкт" відноситься до ссавця, включаючи в себе, але не обмежуючись ними, людину, бика, коня, представника котячих, собаку, гризуна або примата. У деяких варіантах здійснення даного винаходу індивідуум є людиною.

40 У даному контексті термін "ефективна кількість" відноситься до кількості агента, такого як одноклоновий антитіло, сконструйована імунна ефекторна клітина або його фармацевтична композиція, достатнього для лікування певного порушення, патологічного стану або захворювання, наприклад, досягаючи поліпшення, ослаблення, зменшення інтенсивності та/або затримки розвитку одного або більшої кількості симптомів. Відносно раку, ефективна кількість включає кількість, достатню для того, щоб викликати зменшення об'єму пухлини і/або зменшення швидкості росту пухлини (наприклад, для пригнічення росту пухлини), або запобігання або затримання іншої небажаної проліферації клітин. У деяких варіантах здійснення даного винаходу ефективна кількість є кількістю, достатньою для затримки розвитку. У деяких

варіантах реалізації ефективна кількість є кількістю, достатньою для попередження або затримки розвитку рецидиву. Ефективна кількість може бути введена за одне або декілька введень. Ефективна кількість лікарського засобу або композиції може: (i) знижувати кількість ракових клітин; (ii) зменшувати розмір пухлини; (iii) пригнічувати, затримувати, уповільнювати до деякої міри і, переважно, зупиняти інфільтрацію ракових клітин в периферичні органи; (iv) пригнічувати (тобто, уповільнювати до деякої міри і, переважно, зупиняти) метастазування пухлини; (v) пригнічувати ріст пухлини; (vi) попереджати або затримувати виникнення і/або розвиток рецидиву пухлини; і/або (vii) полегшувати до деякої міри один або більшу кількість симптомів, асоційованих з раком.

Термін "ад'ювантні умови" відноситься до клінічної ситуації, при якій індивідум мав рак, в анамнезі, і, як правило (але не обов'язково), відповідав на терапію, яка включала, але не обмежувалася цим, хірургічне втручання (наприклад, хірургічну резекцію), променевою терапію і хіміотерапію. Однак через наявність в їх анамнезі раку, ці індивідууми розцінюються як схильні до ризику розвитку захворювання. Лікування або введення в "ад'ювантних умовах" відноситься до чергового режиму лікування. Ступінь ризику (наприклад, коли індивідум в ад'ювантних умовах розцінюється як схильний до "високого ризику" або "низького ризику") залежить від кількох факторів, найчастіше від ступеня тяжкості захворювання при першому лікуванні.

Термін "неоад'ювантні умови" відноситься до клінічної ситуації, при якій спосіб здійснюють до первинної/остаточної терапії.

У даному контексті термін "затримка" розвитку раку означає відкладання, перешкоджання, уповільнення, стабілізацію і/або відстрочку розвитку захворювання. Ця затримка може бути різної тривалості в часі, в залежності від анамнезу захворювання і/або індивідуума, який отримує лікування. Як очевидно фахівцям в даній галузі техніки, достатня або значна затримка може, по суті, включати в себе запобігання, оскільки захворювання у індивідуума не розвивається. Спосіб, який "затримує" розвиток раку є способом, який зменшує ймовірність розвитку захворювання в даному часовому інтервалі і/або зменшує ступінь захворювання в даному часовому інтервалі в порівнянні з незастосуванням способу. Як правило, такі порівняння ґрунтуються на клінічних дослідженнях з включенням статистично значущого числа індивідуумів. Розвиток раку можна виявити за допомогою стандартних методів, включаючи, але не обмежуючись ними, комп'ютерну аксіальну томографію (CAT Scan), магнітно-резонансну томографію (MPT), абдомінальне ультразвукове дослідження, тести на згортання крові, артеріографію або біопсію. Розвиток може також відноситися до прогресування раку, який може бути спочатку невиявним, і включає виникнення, рецидив і перші прояви.

Термін "фармацевтичний склад" відноситься до препарату, представленого в формі, що забезпечує ефективність біологічної активності активного інгредієнта, і не містить додаткових компонентів, що володіють неприйнятною токсичністю для суб'єкта, якому слід вводити склад. Такі склади є стерильними. "Стерильний" склад є асептичним або не містить будь-яких живих мікроорганізмів і їх спор.

У даному контексті термін "носії" включають в себе фармацевтично прийнятні носії, допоміжні речовини або стабілізатори, які нетоксичні для клітини або ссавців, що піддаються їх впливу при застосовуваних дозах і концентраціях. Часто фізіологічно прийнятний носій є водним рН-буферизуючим розчином. Приклади фізіологічно прийнятних носіїв включають в себе буфери, наприклад, на основі фосфорної, лимонної та інших органічних кислот; антиоксиданти, що включають аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензиламонію хлорид; гексаметонію хлорид; бензалконію хлорид; бензетонію хлорид; феноловий, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; і м-крезол); низькомолекулярні (менш ніж приблизно 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, які включають глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі засоби, такі як ЕДТА; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворюючі протиіони, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, Zn-білкові комплекси); і/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі як TWEEN™, поліетиленгліколь (ПЕГ) і PLURONICS™, або поліетиленгліколь (ПЕГ).

Запропонований в даному документі термін "розріджувач" означає фармацевтично прийнятний (безпечний і нетоксичний для введення людині) і придатний для приготування рідкої композиції, такої як композиція, відновлена після ліофілізації. Приклади розріджувачів включають в себе стерильну воду, бактеріостатичну воду для ін'єкцій (BWFІ), рН-буферизуючий розчин (наприклад, забуферений фосфатом фізіологічний розчин), стерильний сольовий

розчин, розчин Рінгера або розчин глюкози. В альтернативному варіанті здійснення даного винаходу розріджувачі можуть включати в себе водні розчини солей і/або буферів.

"Консервант" представляє собою сполуки, яка може бути додана до складів, описаних в даному документі, для зниження активності бактерій. Додавання консерванту може, наприклад, сприяти одержанню складу багаторазового застосування (багатодозового складу). Приклади потенційних консервантів включають в себе хлорид октадецилдиметилбензиламонію, хлорид гексаметонію, хлорид бензалконію (суміш хлоридів алкілбензилдиметиламонію, в яких алкіли є сполуками з довгим ланцюгом) і хлорид бензетонію. Інші типи консервантів включають в себе ароматичні спирти, такі як фенол, бутіл і бензиловий спирт, алкілпарабени, такі як метил або пропілпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол і м-крезол. Найкращим консервантом в даному винаході є бензиловий спирт.

"Стабільний" склад є складом, в якому білок по суті зберігає свою фізичну і хімічну стабільність і цілісність при зберіганні. Різні аналітичні методи для вимірювання стабільності білка доступні в даній галузі техніки і розглядаються в публікації Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). Стабільність можна виміряти при вибраній температурі протягом вибраного періоду часу. Для швидкого скринінгу складу можна витримати при 40 °C протягом періоду часу від 2 тижнів до 1 місяця, після чого виміряти стабільність. Якщо склад зберігається при температурі 2-8 °C, як правило, він повинен бути стабільним при температурі 30 °C або 40 °C протягом щонайменше 1 місяця і/або повинен бути стабільним при температурі 2-8 °C протягом щонайменше 2 років, якщо склад зберігається при температурі 30 °C, як правило, він повинен бути стабільним протягом щонайменше 2 років при температурі 30 °C і/або повинен бути стабільним при температурі 40 °C протягом щонайменше 6 місяців. Наприклад, ступінь агрегації під час зберігання може використовуватися як індикатор стабільності білка. Таким чином, "стабільний" склад може бути таким, в якому менше 10 %, а переважно менше 5 % білка присутні в формі єдиного скупчення в складі. В інших варіантах здійснення даного винаходу можна визначити будь-який ступінь збільшення скупчення при зберіганні складу.

"Відновлений" склад є складом, який одержують шляхом розчинення ліофілізованого білка або препарату антитіла в розчиннику, в результаті чого білок диспергується по всьому об'єму. Відновлюваний склад є придатним для введення (наприклад, підшкірного введення) пацієнту, який повинен отримувати лікування із застосуванням білка, що представляє інтерес, і в деяких варіантах здійснення даного винаходу може бути таким, який є придатним для парентерального або внутрішньовенного введення.

"Ізотонічний" склад є таким складом, який має по суті такий ж осмотичний тиск, що і кров людини. Ізотонічні склади зазвичай мають осмотичний тиск від приблизно 250 до 350 мОсм. Термін "гіпотонічний" визначає склад з осмотичним тиском, який є нижчим осмотичного тиску крові людини. Відповідно, термін "гіпертонічний" застосовується для опису складу з осмотичним тиском, який є вище осмотичного тиску крові людини. Ізотонічність можна виміряти, наприклад, за допомогою парофазного осмометра або осмометра за точкою замерзання. Склади за даним винаходом стають гіпертонічними після додавання солі і/або буфера.

Зрозуміло, що варіанти здійснення цього винаходу, описані в даному документі, включають в себе "що складаються" і/або "що складаються по суті з" варіантів здійснення.

В цьому документі посилання на "приблизно" щодо значення або параметра включає (і описує) варіанти, які спрямовані на це значення або параметр як такі. Наприклад, опис, посилаючись на "приблизно X", включає опис "X".

В цьому контексті посилання на "не" відносно значення або параметра, зазвичай, означає "крім" значення або параметра. Наприклад, вираз "зазначений спосіб не застосовують для лікування раку типу X" означає, що цей спосіб не застосовують для лікування типів раку, відмінних від X.

У даному документі термін "приблизно X-Y" повинен мати те ж значення, що і "від приблизно X до приблизно Y".

При використанні по тексту даного документа і доданої формули винаходу, слова в однині означають також множину, якщо з контексту явно не слідує інше.

II. однодоменні антитіла

В одному аспекті даного винаходу пропонуються однодоменні антитіла, їх антигензв'язуючі фрагменти і антигензв'язуючі білки, що містять будь-яке з однодоменних антитіл. Типові однодоменні антитіла наведені в Таблиці 2 нижче.

Типові однодоменні антитіла.

Ab	Тип. AA SEQ ID	Тип. NA SEQ ID	CDR1	CDR2	CDR3
Типові однодоменні антитіла анти-CD19					
CD19 V _H H	76	101	INRMG (SEQ ID NO: 1)	SITVRGITNYADSVKG (SEQ ID NO: 2)	VSSNRDPDY (SEQ ID NO: 3)
Типові однодоменні антитіла анти-CD20					
CD20 V _H H	77	102	IGTMG (SEQ ID NO: 4)	AIRWSTGGTRYADSVKG (SEQ ID NO: 5)	DRLSLDLSGRYHYNPAVYDY (SEQ ID NO: 6)
Типові однодоменні антитіла анти-BCMA					
269A 37346	78	103	SGFTLDYYAIG (SEQ ID NO: 7)	CISRSDBGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 18)	AGADCSGYLRDYEY (SEQ ID NO: 29)
269A 37348	79	104	SGRTFSTYGMA (SEQ ID NO: 8)	SKASMNYSGRYYADSVKG (SEQ ID NO: 19)	AGTGCSTYGCFDAQIIDY (SEQ ID NO: 30)
269A 37917	80	105	SGRTFTMG (SEQ ID NO: 9)	AISLSPTLAYAESVKG (SEQ ID NO: 20)	ADRKSVMSIRPDY (SEQ ID NO: 31)
269A3 7355	81	106	SGGIFVINAMG (SEQ ID NO: 10)	SIRGLGRTNYDDSVKG (SEQ ID NO: 21)	VYVTLGGVNRDY (SEQ ID NO: 32)
269A 37915	82	107	SGRTFSSIVMG (SEQ ID NO: 11)	AIMWNDGITYLQDSVKG (SEQ ID NO: 22)	ASKGRYSEYDY (SEQ ID NO: 33)
269A 37936	83	108	SGFTFDRAVIV (SEQ ID NO: 12)	FIKPSDGTIYYIDSLKG (SEQ ID NO: 23)	ASPEDWYTDWIDWSIYR (SEQ ID NO: 34)
269A 37953	84	109	STYTVNSDVMG (SEQ ID NO: 13)	AIMWNDGITYLQDSVKG (SEQ ID NO: 24)	ASKGRYSEYDY (SEQ ID NO: 35)
269A 37965	85	110	SGATLTNDHMA (SEQ ID NO: 14)	AIDWSGRTTNYADPVEG (SEQ ID NO: 25)	VLRAWISYDNDY (SEQ ID NO: 36)
269A 37972	86	111	SGGTLSKNTVA (SEQ ID NO: 15)	SITWDGRTTYYADSVKG (SEQ ID NO: 26)	DLGKWPAGPADY (SEQ ID NO: 37)
269A 37353	87	112	SEHTFSSHVMG (SEQ ID NO: 16)	VIGWRDISTSYADSVKG (SEQ ID NO: 27)	ARRIDAADFDS (SEQ ID NO: 38)
269A 37948	88	113	SGRAFSTYFMA (SEQ ID NO: 17)	GIAWSGGSTAYADSVKG (SEQ ID NO: 28)	SRGIEVEEFGA (SEQ ID NO: 39)
Типові однодоменні антитіла анти-CD38					
38A3 7333	89	114	SGLTFSSYPMM (SEQ ID NO: 40)	RISDSGGYTNYYDDSVKG (SEQ ID NO: 52)	ILGLPT (SEQ ID NO: 64)
38A3 7336	90	115	SGFTFSSNWMY (SEQ ID NO: 41)	TISTDGRGTYKDSVKG (SEQ ID NO: 53)	KEPRVLMAYLRNLGDFGS (SEQ ID NO: 65)
38A3 7699	91	116	SGRIFSINAMG (SEQ ID NO: 42)	AISTAGSTNYGDSVKG (SEQ ID NO: 54)	LNFPYPVY (SEQ ID NO: 66)
38A3 7331	92	117	SGSIFKVRVFAMS (SEQ ID NO: 43)	SISSGETTTYADSVKG (SEQ ID NO: 55)	ADHTFTGDF (SEQ ID NO: 67)
38A3 7717	93	118	TGKVFSIYDMG (SEQ ID NO: 44)	EITSSGTTHYDDFVSG (SEQ ID NO: 56)	NHVFGGSY (SEQ ID NO: 68)
38A3 7719	94	119	SASIFTRLPMG (SEQ ID NO: 45)	GIVPSGRINYADSVKG (SEQ ID NO: 57)	ADTFPLPT (SEQ ID NO: 69)
38A3 7330	95	120	SGRAYATMA (SEQ ID NO: 46)	HLRVSGDTTYTDSVKG (SEQ ID NO: 58)	GPYGILAAARVSNPGNYDY (SEQ ID NO: 70)
38A3 7334	96	121	SGLTFSSYIMG (SEQ ID NO: 47)	EISSGGMTSYADSVKG (SEQ ID NO: 59)	APERGSIWYSRYEYKY (SEQ ID NO: 71)
38A3 7730	97	122	SQGIFTINAMG (SEQ ID NO: 48)	EVSSGGRTDYADSVKG (SEQ ID NO: 60)	VSGWHVFGDRIV (SEQ ID NO: 72)
38A3 7340	98	123	SGRTFSSYAMA (SEQ ID NO: 49)	SISTSGGITDYADSVKG (SEQ ID NO: 61)	ARTWYLRTSLQYDY (SEQ ID NO: 73)

38A3 7731	99	124	SGTIVSISTMG (SEQ ID NO: 50)	TITRRGRNTNYTDSVKG (SEQ ID NO: 62)	AEVQLDIWASAYDY (SEQ ID NO: 74)
38A3 7326	100	125	SGRTYAMG (SEQ ID NO: 51)	TISGAGNTKYADSVKG (SEQ ID NO: 63)	AGKWFPAAANEY (SEQ ID NO: 75)

Однодоменні антитіла анти-CD19

В одному аспекті даного винаходу пропонуються виділені однодоменні антитіла, які специфічно зв'язуються з CD19, такими як CD19 людини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 модулює активність CD19. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 є антагоністичним антитілом.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD19, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 76. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD19, що містить щонайменше одну, щонайменше дві або всі три CDR, вибрані з (a) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1; (b) CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2; і (c) CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD19, що містить три CDR, що містять: (a) CDR1, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 1; (b) CDR2, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 2; і (c) CDR3, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 3. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD19 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CDR, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичністю, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції відносно встановленої послідовності, проте однодоменне антитіло анти-CD19, що містить цю послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з CD19. У деяких варіантах здійснення антитіло анти-CD19 характеризується дозрілою афінністю. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD19, що містить три CDR, які містять: (a) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1; (b) CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2; і (c) CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD19 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD19, що містить домен V_HH, який характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 76. У деяких варіантах здійснення даного винаходу послідовність V_HH, який характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 76.

92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичністю, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції відносно встановленої послідовності, проте однодоменне антитіло анти-CD19, що містить цю послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з CD19. У деяких варіантах здійснення даного винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вставлені і/або видалені в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 76. У деяких варіантах здійснення даного винаходу заміни, вставки або делеції зустрічаються в областях, що знаходяться за межами CDR (тобто, в FR). У деяких випадках однодоменне антитіло анти-CD19 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76, що включає в себе посттрансляційні модифікації цієї послідовності. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD19 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імунoglobуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD19, що містить домен V_HH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу функціональні епітопи можуть бути картовані за допомогою комбінаторного аланінового сканування. У цьому процесі стратегію комбінаторного аланінового сканування можна застосовувати для ідентифікації амінокислот у білку CD19, які необхідні для взаємодії з однодоменними антитілами анти-CD19. У деяких варіантах здійснення даного винаходу епітоп є конформаційною і кристалічною структурою однодоменного антитіла анти-CD19, зв'язаного з CD19, яке можна застосовувати для ідентифікації епітопів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з тим же самим епітопом, що і будь-яке з однодоменних антитіл анти-CD19, описаних в даному документі. Наприклад, в деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-CD19, яке містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-CD19 або його антигензв'язуючий фрагмент, який специфічно зв'язується з CD19, конкуруючи з будь-яким з описаних в даному документі однодоменних антитіл анти-CD19. У деяких варіантах здійснення даного винаходу конкурентне зв'язування можна визначити за допомогою аналізу ELISA. Наприклад, в деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з CD19, конкуруючи з однодоменним антитілом анти-CD19, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-CD19 або антигензв'язуючий білок, що містить будь-яке з однодоменних антитіл анти-CD19, описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD19 є моноклональним антитілом, що включає в себе верблуже, химерне, гуманізоване або людське антитіло. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD19 є фрагментом антитіла, наприклад, фрагментом V_HH. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD19 є повнорозмірним антитілом тільки з важким ланцюгом, що містить Fc-область будь-якого класу або ізотипу антитіл, такого як IgG1 або IgG4. У деяких варіантах даного винаходу Fc-область послаблює або мінімізує ефекторну функцію.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD19 (таке як однодоменне антитіло анти-CD19) або антигензв'язуючий білок згідно з будь-яким з вищенаведених варіантів здійснення даного винаходу може включати в себе будь-яку з ознак окремо або в комбінації, як описано в розділах 1-7 "Характеристики антитіл" нижче.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує будь-яке з антитіл анти-CD19 (наприклад, однодоменні антитіла анти-CD19), описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує однодоменне антитіло анти-CD19, при цьому нуклеїнова кислота містить послідовність, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 101. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що містить послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 101. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується вектор (наприклад, експресуючий вектор), що містить таку нуклеїнову кислоту. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується клітина-господар, що містить таку нуклеїнову кислоту. В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується спосіб одержання

антитіла анти-CD19, причому зазначений спосіб включає культивування клітини-господаря, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло анти-CD19, як описано вище, в умовах, що підходять для експресії антитіла анти-CD19, і, в деяких випадках, витягування антитіла анти-CD19 з клітини-господаря (або середовища, в якому культивують клітину-господаря).

5 Однодоменні антитіла анти-CD20

В одному аспекті даного винаходу пропонуються виділені однодоменні антитіла, які специфічно зв'язуються з CD20, такими як CD20 людини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 модулює активність CD20. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 є антагоністичним антитілом.

10 У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD20, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

20 У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD20, що містить щонайменше одну, щонайменше дві або всі три CDR, вибрані з (a) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; (b) CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5; і (c) CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

25 У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD20, що містить три CDR: (a) CDR1, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 4; (b) CDR2, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 5; і (c) CDR3, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD20 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CDR, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичністю, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції відносно встановленої послідовності, проте однодоменне антитіло анти-CD20, що містить цю послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з CD20. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 характеризується дозрілою афінністю. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

45 У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD20, що містить три CDR: (a) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; (b) CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5; і (c) CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

50 У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD20, що містить домен V_HH, який характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу послідовність V_HH, який характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичністю, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції відносно встановленої послідовності, проте

однодоменне антитіло анти-CD20, що містить цю послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з CD20. У деяких варіантах здійснення даного винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вставлені і/або видалені в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу заміни, вставки або делеції зустрічаються в областях, що знаходяться за межами CDR (тобто, в FR). У деяких випадках однодоменне антитіло анти-CD20 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77, що включає в себе посттрансляційні модифікації цієї послідовності.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-CD20, що містить домен V_HH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу функціональні епітопи можуть бути картовані за допомогою комбінаторного аланінового сканування. У цьому процесі стратегію комбінаторного аланінового сканування можна застосовувати для ідентифікації амінокислот у білку CD20, які необхідні для взаємодії з однодоменними антитілами анти-CD20. У деяких варіантах здійснення даного винаходу епітоп є конформаційною і кристалічною структурою однодоменного антитіла анти-CD20, зв'язаного з CD20, яке можна застосовувати для ідентифікації епітопів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з тим же самим епітопом, що і будь-яке з однодоменних антитіл анти-CD20, описаних в даному документі. Наприклад, в деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, що зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-CD20, яке містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-CD20 або його антигензв'язуючий фрагмент, який специфічно зв'язується з CD20, конкуруючи з будь-яким з описаних в даному документі однодоменних антитіл анти-CD20. У деяких варіантах здійснення даного винаходу конкурентне зв'язування можна визначити за допомогою аналізу ELISA. Наприклад, в деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з CD20, конкуруючи з однодоменним антитілом анти-CD20, яке містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-CD20 або антигензв'язуючий білок, що містить будь-яке з однодоменних антитіл анти-CD20, описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD20 є моноклональним антитілом, яке включає в себе верблуже, химерне, гуманізоване або людське антитіло. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD20 є фрагментом антитіла, наприклад, фрагментом V_HH. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD20 є повнорозмірним антитілом тільки з важким ланцюгом, що містить Fc-область будь-якого класу або ізотипу антитіл, такого як IgG1 або IgG4. У деяких варіантах даного винаходу Fc-область послаблює або мінімізує ефекторну функцію.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD20 (таке як однодоменне антитіло анти-CD20) або антигензв'язуючий білок згідно з будь-яким з вищенаведених варіантів здійснення даного винаходу може включати в себе будь-яку з ознак окремо або в комбінації, як описано в розділах 1-7 "Характеристики антитіл" нижче.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує будь-яке з антитіл анти-CD20 (наприклад, однодоменні антитіла анти-CD20), описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує однодоменне антитіло анти-CD20, при цьому нуклеїнова кислота містить послідовність, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 102. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що містить послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 102. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується вектор (наприклад, експресуючий вектор), що містить таку нуклеїнову кислоту. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується клітина-господар, що містить таку нуклеїнову кислоту. В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується спосіб одержання антитіла анти-CD20, причому зазначений спосіб включає культивування клітини-господаря, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло анти-CD20, як описано вище, в умовах, що підходять для експресії антитіла анти-CD20, і, в деяких випадках, витягування антитіла анти-CD20 з клітини-господаря (або середовища, в якому культивують клітину-господаря).

Однодоменні антитіла анти-BCMA

В одному аспекті даного винаходу пропонуються виділені однодоменні антитіла, які специфічно зв'язуються з ВСМА, такими як ВСМА людини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-ВСМА модулює активність ВСМА. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-ВСМА є антагоністичним антитілом.

В-клітинний зрілий антиген (ВСМА), також відомий як CD269, є членом надсімейства рецепторів фактора некрозу пухлин, а саме TNFRSF17 (Thompson et al., J. Exp. Medicine, 192 (1): 129-135, 2000.). ВСМА людини практично виключно експресується в клітинах плазми і клітинах множинної мієломи (див., наприклад, Novak et al., Blood, 103 (2): 689-694, 2004; Neri et al., Clinical Cancer Research, 73 (19): 5903-5909; Felix et al., Mol. Oncology, 9 (7): 1348-58, 2015). ВСМА може зв'язувати активуючий фактор В-клітин (BAFF) і ліганд, що індукує проліферацію (APRIL) (наприклад, Maskay et al., 2003 and Kalled et al., Immunological Review, 204: 43-54, 2005). ВСМА може бути придатною пухлинною антигенною мішенню для імунотерапевтичних агентів при лікуванні множинної мієломи. Антитіла з високою афінністю можуть блокувати зв'язування між ВСМА і його нативними лігандами BAFF і APRIL. Однодоменні антитіла анти-ВСМА можна застосовувати в комбінації з клітинною імунотерапією із застосуванням CAR-Т-клітин, наприклад, для посилення цитотоксичних ефектів, спрямованих проти пухлинних клітин.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 78. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 79. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 80. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 81. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 82. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 83. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 84. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 85. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 86. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 87. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 88. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-ВСМА є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-ВСМА є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-ВСМА містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить щонайменше одну, щонайменше дві або всі три CDR, вибрані з (а) CDR1, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 7-17; (b) CDR2, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 18-28; і (c) CDR3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 29-39. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-ВСМА є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-ВСМА є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-ВСМА містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить три CDR, що містять: (а) CDR1, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності, вибраної з SEQ ID NO: 7-17; (b) CDR2, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності, вибраної з SEQ ID NO: 18-28; і (c) CDR3, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-BCMA, що містить три CDR, що містять: (a) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13; (b) CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24; і (c) CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-BCMA, що містить три CDR, що містять: (a) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14; (b) CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25; і (c) CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA є гуманізованим. В деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-BCMA, що містить три CDR, що містять: (a) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15; (b) CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26; і (c) CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-BCMA, що містить три CDR, що містять: (a) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16; (b) CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27; і (c) CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-BCMA, що містить три CDR, що містять: (a) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; (b) CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28; і (c) CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-BCMA, що містить домен $V_{\text{H}}\text{H}$, який характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності, вибраної з SEQ ID NO: 78-88. У деяких варіантах здійснення даного винаходу послідовність $V_{\text{H}}\text{H}$, який характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичністю, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції відносно встановленої послідовності, проте однодоменне антитіло анти-BCMA, що містить цю послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з BCMA. У деяких варіантах здійснення даного винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вставлені і/або видалені в амінокислотній послідовності, вибраній з SEQ ID NO: 78-88. У деяких варіантах здійснення даного винаходу заміни, вставки або делеції зустрічаються в областях, що знаходяться за межами CDR (тобто, в FR). У деяких випадках однодоменне антитіло анти-BCMA містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 78-88, що включає в себе посттрансляційні модифікації цієї послідовності.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-BCMA, що містить домен $V_{\text{H}}\text{H}$, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-BCMA, що містить домен $V_{\text{H}}\text{H}$, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 79. У деяких варіантах здійснення даного винаходу

[illegible]

У деяких варіантах здійснення даного винаходу функціональні епітопи можуть бути картовані за допомогою комбінаторного аланінового сканування. У цьому процесі стратегію комбінаторного аланінового сканування можна застосовувати для ідентифікації амінокислот у білку ВСМА, які необхідні для взаємодії з однодоменими антитілами анти-ВСМА. У деяких варіантах здійснення даного винаходу епітоп є конформаційною і кристалічною структурою однодоменого антитіла анти-ВСМА, зв'язаного з ВСМА, яке можна застосовувати для ідентифікації епітопів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з тим же самим епітопом, що і будь-яке з однодомених антитіл анти-ВСМА, описаних в даному документі. Наприклад, в деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 79. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 80. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 81. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 82. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 83. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 84. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-ВСМА, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 85. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-

BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 86. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 87. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 88.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-BCMA або його антигензв'язуючий фрагмент, який специфічно зв'язується з BCMA, конкуруючи з будь-яким з описаних в даному документі однодоменних антитіл анти-BCMA. У деяких варіантах здійснення даного винаходу конкурентне зв'язування можна визначити за допомогою аналізу ELISA. Наприклад, в деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з BCMA, конкуруючи з однодоменним антитілом анти-BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з BCMA, конкуруючи з однодоменним антитілом анти-BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 79. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з BCMA, конкуруючи з однодоменним антитілом анти-BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 80. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з BCMA, конкуруючи з однодоменним антитілом анти-BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 81. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з BCMA, конкуруючи з однодоменним антитілом анти-BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 82. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з BCMA, конкуруючи з однодоменним антитілом анти-BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 83. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з BCMA, конкуруючи з однодоменним антитілом анти-BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 84. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з BCMA, конкуруючи з однодоменним антитілом анти-BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 85. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з BCMA, конкуруючи з однодоменним антитілом анти-BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 86. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з BCMA, конкуруючи з однодоменним антитілом анти-BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 87. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з BCMA, конкуруючи з однодоменним антитілом анти-BCMA, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 88.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-BCMA або антигензв'язуючий білок, що містить будь-яке з однодоменних антитіл анти-BCMA, описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-BCMA є моноклональним антитілом, яке включає в себе верблуже, химерне, гуманізоване або людське антитіло. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-BCMA є фрагментом антитіла, наприклад, фрагментом V_HH. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-BCMA є повнорозмірним антитілом тільки з важким ланцюгом, що містить Fc-область будь-якого класу або ізо типу антитіл, такого як IgG1 або IgG4. У деяких варіантах даного винаходу Fc-область послаблює або мінімізує ефекторну функцію.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-BCMA (таке як однодоменне антитіло анти-BCMA) або антигензв'язуючий білок згідно з будь-яким з вищенаведених варіантів здійснення даного винаходу може включати в себе будь-яку з ознак окремо або в комбінації, як описано в розділах 1-7 "Характеристики антитіл" нижче.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує будь-яке з антитіл анти-BCMA (наприклад, однодоменні антитіла анти-BCMA), описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує однодоменне антитіло анти-BCMA, при цьому нуклеїнова кислота містить послідовність, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності нуклеїнової кислоти, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 103-113. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 103-113. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується вектор (наприклад,

експресуючий вектор), що містить таку нуклеїнову кислоту. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується клітина-господар, що містить таку нуклеїнову кислоту. В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується спосіб одержання антитіла анти-BCMA, причому зазначений спосіб включає культивування клітини-господаря, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло анти-BCMA, як описано вище, в умовах, що підходять для експресії антитіла анти-BCMA, і, в деяких випадках, витягування антитіла анти-BCMA з клітини-господаря (або середовища, в якому культивують клітину-господаря).

Однодоменні антитіла анти-CD38

В одному аспекті даного винаходу пропонується виділені однодоменні антитіла, які специфічно зв'язуються з CD38, такими як CD38 людини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD38 модулює активність CD38. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD38 є антагоністичним антитілом.

CD38 є трансмембранним глікопротеїном типу II, асоційованим з рецепторами клітинної поверхні, який регулює приплив цитоплазматичного Ca^{2+} і опосередковує передачу сигналу в лімфоїдних і мієлоїдних тканинах (Kopple et al., J Immunol, 161: 4702-8, 1998; Deaglio et al., Blood, 109: 5390-8, 2007). CD38 людини сильно і рівномірно експресується на клітинах мієломи, і в той же час експресується у відносно низьких рівнях на нормальних лімфоїдних і мієлоїдних клітинах і в деяких тканинах негемопоетичного походження, що робить його потенційною мішенню при лікуванні мієломи (див., наприклад, Lin et al., Am J Clin Pathol, 2004, 121: 482; HM Lokhorst et al., New Eng. J. Med., 2015, 373: 13).

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 89. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 90. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 91. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 92. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 93. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 94. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 95. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, з Здобувши одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 96. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 97. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 98. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 99. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, що містить одну, дві або всі три CDR амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 100. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD38 є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD38 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD38 містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, що містить щонайменше одну, щонайменше дві або всі три CDR, вибрані з (a) CDR1, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 40-51; (b) CDR2, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 52-63; і (c) CDR3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 64-75. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD38 є верблужим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD38 є гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD38 містить акцепторний людський каркас, наприклад, каркас людського імуноглобуліну або людський консенсусний каркас.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD38, що містить три CDR, що містять: (a) CDR1, що характеризується щонайменше приблизно

послідовності, проте однодоменне антитіло анти-CD38, що містить цю послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з CD38. У деяких варіантах здійснення даного винаходу в цілому від 1 до 10 амінокислот замінені, вставлені і/або видалені в амінокислотній послідовності, вибраній з SEQ ID NO: 89-100. У деяких варіантах здійснення даного винаходу заміни, вставки або делеції зустрічаються в областях, що знаходяться за межами CDR (тобто, в FR). У деяких випадках однодоменне антитіло анти-CD38 містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 89-100, що включає в себе посттрансляційні модифікації цієї послідовності.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-CD38, що містить домен V_HH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 89. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 89. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-CD38, що містить домен V_HH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 90. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 90. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-CD38, що містить домен V_HH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 91. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 91. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-CD38, що містить домен V_HH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 92. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 92. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-CD38, що містить домен V_HH, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 93. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 93. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-CD38, що містить домен V_HH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 94. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 94. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-CD38, що містить домен V_HH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 95. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 95. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-CD38, що містить домен V_HH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 96. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 96. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-CD38, що містить домен V_HH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 97. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 97. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-CD38, що містить домен V_HH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 98. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 98. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-CD38, що містить домен V_HH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 99. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 99. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділене однодоменне антитіло анти-CD38, що містить домен V_HH, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 100. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 100.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу функціональні епітопи можуть бути картовані за допомогою комбінаторного аланінового сканування. У цьому процесі стратегію комбінаторного аланінового сканування можна застосовувати для ідентифікації амінокислот у білку CD38, які необхідні для взаємодії з однодоменними антитілами анти-CD38. У деяких варіантах здійснення даного винаходу епітоп є конформаційною і кристалічною структурою однодоменого антитіла анти-CD38, зв'язаного з CD38, яке можна застосовувати для ідентифікації епітопів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з тим же самим епітопом, що і будь-яке з однодоменних антитіл анти-CD38, описаних в даному документі. Наприклад, в деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що і однодоменне антитіло анти-CD38, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 89. У деяких варіантах

[illegible][illegible]

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-CD38 або антигенз'язуючий білок, що містить будь-яке з односторонніх антитіл анти-CD38, описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD38 є моноклональним

антитілом, яке включає в себе верблуже, химерне, гуманізоване або людське антитіло. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-BCMA є фрагментом антитіла, наприклад, фрагментом V_HH. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD38 є повнорозмірним антитілом тільки з важким ланцюгом, що містить Fc-область будь-якого класу або ізотипу антитіл, такого як IgG1 або IgG4. У деяких варіантах даного винаходу Fc-область послаблює або мінімізує ефекторну функцію.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD38 (таке як однодоменне антитіло анти-CD38) або антигензв'язуючий білок згідно з будь-яким з вищенаведених варіантів здійснення даного винаходу може включати в себе будь-яку з ознак окремо або в комбінації, як описано в розділах 1-7 "Характеристики антитіл" нижче.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує будь-яке з антитіл анти-CD38 (наприклад, однодоменні антитіла анти-CD38), описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує однодоменне антитіло анти-CD38, при цьому нуклеїнова кислота містить послідовність, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності нуклеїнової кислоти, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 114-125. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 114-125. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується вектор (наприклад, експресуючий вектор), що містить таку нуклеїнову кислоту. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується клітина-господар, що містить таку нуклеїнову кислоту. В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується спосіб одержання антитіла анти-CD38, причому зазначений спосіб включає культивування клітини-господаря, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло анти-CD38, як описано вище, в умовах, що підходять для експресії антитіла анти-CD38, і, в деяких випадках, витягування антитіла анти-CD38 з клітини-господаря (або середовища, в якому культивують клітину-господаря).

Характеристики антитіл

1. Афіність антитіл

У деяких варіантах здійснення даного винаходу запропонованого в даному документі антитіло має константу дисоціації (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ або $\leq 0,001$ нМ (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М).

У деяких варіантах реалізації даного винаходу K_d вимірюють за допомогою аналізу зв'язування антигену, міченого радіоактивним ізотопом (RIA), із застосуванням Fab-версії або фрагмента V_HH антитіла, що представляє інтерес, і його антигену згідно із описаним нижче аналізом. Наприклад, афіність зв'язування Fab з антигеном в розчині вимірюють шляхом врівноваження Fab з мінімальною концентрацією (125 I)-міченого антигену в присутності серії розведень неміченого антигену з подальшим захопленням зв'язаного антигену на планшеті, вкритому антитілом анти-Fab (див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999)). Для визначення умов аналізу багатолункові планшети MICROTITER® (Thermo Scientific) покривали протягом ночі уловлюючим антитілом анти-Fab (Cappel Labs) в концентрації 5 мкг/мл в 50 мМ розчині карбонату натрію (pH 9,6), а потім блокували 2 % (мас./об.) розчином бичачого сироваткового альбуміну в PBS протягом двох-п'яти годин при кімнатній температурі (приблизно 23 °C). У планшеті, що не містить адсорбенту (Nunc № 269620), змішували 100 пМ або 26 пМ [125 I]-антигену, що представляє інтерес, з серійними розведеннями Fab (наприклад, згідно з оцінкою антитіла до VEGF, Fab-12, описаного в публікації Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)). Потім Fab, що представляє інтерес, інкубували протягом ночі; в той же час, інкубування могли продовжувати протягом більш тривалого періоду (наприклад, приблизно 65 годин) для гарантії досягнення рівноваги. Потім суміш переносили на планшет для захоплення і інкубували при кімнатній температурі (наприклад, протягом години). Потім розчин видаляли і планшет промивали вісім разів 0,1 % полісорбатом-20 (TWEEN-20®) в PBS. Після висушування планшетів додавали 150 мкл сцинтилятора (MICROSCINT-20™; Packard) на лунку і робили підрахунок планшетів на гамма-лічильнику TOPCOUNT™ протягом десяти хвилин. Концентрації кожного Fab, що забезпечували зв'язування, яке менше або дорівнює 20 % від максимального, відбирали для застосування в конкурентному аналізі зв'язування.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу, K_d вимірюють за допомогою аналізу поверхневого плазмонного резонансу при 25 °C, використовуючи BIACORE®-2000 або BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Піскатауей, штат Нью-Джерсі) при 25 °C з чіпами CM5, що іммобілізовані антигеном при ~ 10 одиницях відповіді (RU). Якщо коротко, чіпи біосенсора з

карбоксиметильованим декстраном (CM5, BIAcore, Inc.) активували N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)-карбодіімідгідрохлоридом (EDC) та N-гідрокисукцинімідом (NHS) згідно з інструкціями постачальника. Антиген розбавляли 10 мМ розчином ацетату натрію, pH 4.8, до 5 мкг/мл (~ 0,2 мкм) і вводили при швидкості потоку 5 мкл/хвилину, досягаючи приблизно 10

5 одиниць відповіді (RU) зв'язаного білка. Після введення антигену вводили 1 М розчин етаноламіну для блокування непрореагованих груп. Для вимірювання кінетичних параметрів дворазові серійні розведення Fab або V_HH антитіла, що представляє інтерес (від 0,78 нМ до 500 нМ), вводили в PBS, що містить 0,05 % полісорбату 20 (TWEEN-20™) як поверхнево-активну речовину (PBST) при 25 °C зі швидкістю потоку, що становить приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (k_{on}) і швидкості дисоціації (k_{off}) розраховували, використовуючи просту взаємно

10 однозначну модель зв'язування Ленгмюра (програма для обробки даних (BIAcore®, версія 3.2) шляхом одночасної підгонки сенсограм асоціації і дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (K_d) розраховували як співвідношення k_{off}/k_{on}. Див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999). Якщо швидкість асоціації згідно із вищеописаним аналізом поверхневого плазмонного резонансу перевищує 10⁶ M⁻¹ s⁻¹, то її можна визначити за допомогою методики флуоресценції, що вимірює збільшення або зниження інтенсивності випускання флуоресценції (збудження = 295 нм; випускання = 340 нм, смуга пропускання 16 нм) при 25 °C для 20 нМ розчину антитіл проти антигену (в формі Fab) в PBS, pH 7.2, в присутності зростаючих концентрацій антигену, виміряних на спектрометрі, наприклад, на спектрофотометрі з пристроєм зупинки потоку (Aviv Instruments) або спектрофотометрі SLM-AMINCO™ 8000 серії (ThermoSpectronic) з перемішуваною кюветою.

2. Фрагменти антитіл

У деяких варіантах здійснення даного винаходу запропоноване в даному описі антитіло є фрагментом антитіла. Фрагменти антитіл включають в себе, але не обмежуються

25 перерахованим, фрагменти Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv і scFv, V_HH, а також інші фрагменти, описані нижче. Огляд деяких фрагментів антитіл див. В Hudson et al. Nat. Med. 9: 129-134 (2003). Огляд фрагментів scFv див., наприклад, в публікації Pluckthün, в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); див. також в WO 93/16185; і в патентах США №№ 5571894 і 5587458. Опис Fab- і F(ab')₂-фрагментів, що містять залишки епітопів зв'язування рецептора реутилізації і характеризуються збільшеним періодом напіввиведення in vivo, див. в патенті США № 5869046.

Діатіла є фрагментами антитіл, що містять дві антигензв'язуючі ділянки, і можуть бути двовалентними або біспецифічними. Див., наприклад, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134 (2003); і Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

35 Тріатіла і тетратіла також описані в публікації Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134 (2003).

Фрагменти антитіл можна одержати різними способами, включаючи протеолітичний гідроліз інтактного антитіла, а також продукування рекомбінантними клітинами-господарями (наприклад, E. coli або фагом), як описано в даному документі.

3. Химерні і гуманізовані антитіла

У деяких варіантах здійснення даного винаходу запропоноване в даному описі антитіло є химерним антитілом. Деякі химерні антитіла описані, наприклад, в патенті США № 4816567; і Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). В одному прикладі химерне антитіло містить варіабельну область нелюдського походження (наприклад, варіабельну область, яка походить від представників видів верблужих, таких як лама) і константну область людини. У ще одному прикладі химерне антитіло є антитілом з "переключеним класом", в якому змінено клас або підклас в порівнянні з батьківським антитілом. Термін "химерні антитіла" включає антигензв'язуючі фрагменти таких антитіл.

45

У деяких варіантах здійснення даного винаходу химерне антитіло є гуманізованим антитілом. Як правило, нелюдське антитіло гуманізують, щоб зменшити імуногенність для людини і зберегти при цьому специфічність і афінність батьківського нелюдського антитіла. Як правило, гуманізоване антитіло містить один або більшу кількість варіабельних доменів, в яких HVR, наприклад, CDR (або їх частини) одержані з нелюдського антитіла, а FR (або їх частини) одержані з послідовностей антитіл людини. У деяких випадках гуманізоване антитіло також містить щонайменше фрагмент константної області антитіла людини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу деякі FR-залишки в гуманізованому антитілі замінюють відповідними залишками антитіла нелюдського походження (наприклад, антитіла, з якого одержані залишки HVR), наприклад, з метою відновлення або поліпшення специфічності або афінності антитіла.

50

55

Гуманізовані антитіла і способи їх одержання описані, наприклад, в публікаціях Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1619-1633 (2008), і додатково описані, наприклад, в публікаціях

60

Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 (1989); патентах США №№ 5821337, 7527791, 6982321, і 7087409; Kashmiri et al., *Methods* 36: 25-34 (2005) (описано щеплення SDR (α-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 489-498 (1991) (описано "зміна поверхні"); Dall'Acqua et al. *Methods* 36: 43-60 (2005) (описана "перетасування FR"); і Osbourn et al., *Methods* 36: 61-68 (2005) і Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83: 252-260 (2000) (описаний підхід "керованого вибору" перетасування FR).

Каркасні області людини, які можна застосовувати для гуманізації, включають в себе, але не обмежуються ними: каркасні області, вибрані за допомогою методу "найкращої відповідності" (див., наприклад, Sims et al. *J. Immunol.* 151: 2296 (1993)); каркасні області, що походять від консенсусної послідовності антитіл людини конкретної підгрупи варіабельних областей легкого або важкого ланцюга (див., наприклад, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); і Presta et al. *J. Immunol.*, 2623 (1993); зрілі (містять соматичні мутації) каркасні області людини або ембріональні каркасні області людини (див., наприклад, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 1619-1633 (2008)); і каркасні області, одержані при скринінгу бібліотек FR (див., наприклад, Baca et al. *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684 (1997) і Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271: 22611-22618 (1996)).

У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменні антитіла є модифікованими, наприклад, гуманізованими, без зменшення нативної афінності домену до антигену і зі зниженням його імуногенності по відношенню до гетерологічних видів. Наприклад, можна визначити амінокислотні залишки варіабельного домену антитіла (V_H) з антитіла лами, при цьому одна або декілька амінокислот представників сімейства верблужих, наприклад, в каркасних областях, замінюються їх людським аналогом, як було виявлено в консенсусній послідовності людини, без втрати цим поліпептидом своїх типових характеристик, тобто, гуманізація не робить суттєвого впливу на антигензв'язуючу здатність одержаного поліпептиду. Гуманізація однодоменних антитіл представників сімейства верблужих вимагає введення і мутагенезу обмеженої кількості амінокислот в одному поліпептидному ланцюзі. Це контрастує з гуманізацією scFv, Fab', (Fab')₂ і IgG, при якій потрібне введення амінокислотних змін в два ланцюги, легкий і важкий ланцюг, і збереження збірки обох ланцюгів.

Однодоменні антитіла, що містять домен V_H , можуть бути гуманізовані з метою одержання людиноподібних послідовностей. У деяких варіантах здійснення даного винаходу FR області домену V_H , описані в даному документі, містять щонайменше приблизно 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або більше гомологій амінокислотної послідовності з каркасними областями V_H людини. Один типовий клас гуманізованих доменів V_H характеризується тим, що V_H несуть амінокислоту з групи, що складається з гліцину, аланіну, валіну, лейцину, ізолейцину, проліну, фенілаланіну, тирозину, триптофану, метіоніну, серину, треоніну, аспарагіну або глутаміну в положенні 45, такого як, наприклад, L45 і триптофану в положенні 103, згідно з нумерацією Kabat. Як такі, поліпептиди, що відносяться до цього класу, характеризуються високою гомологією амінокислотної послідовності з каркасними областями V_H людини, при цьому зазначені поліпептиди можна вводити людині безпосередньо без ймовірності розвитку небажаної імунної реакції на поліпептид і без навантаження подальшої гуманізації.

Інший типовий клас гуманізованих однодоменних верблужих антитіл описаний в WO 03/035694 і містить гідрофобні залишки FR2, які, як правило, зустрічаються в звичайних антитілах людського походження або антитілах інших видів, при цьому втрата гідрофільності компенсується зарядженням залишком аргініну в положенні 103, який замінює консервативний залишок триптофану, присутній в V_H з дволанцюгових антитіл. Як такі, пептиди, що відносяться до цих двох класів, характеризуються високою гомологією амінокислотної послідовності з каркасними областями V_H людини, при цьому зазначені пептиди можна вводити людині безпосередньо без ймовірності розвитку небажаної імунної реакції на пептид і без навантаження подальшої гуманізації.

4. Людські антитіла

У деяких варіантах здійснення даного винаходу запропоноване в даному документі антитіло є антитілом людини. Антитіла людини можуть бути одержані за допомогою різних методик, відомих в даній галузі техніки. Антитіла людини описані в загальних рисах у van Dijk та van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) і Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20: 450-459 (2008). У даній галузі техніки відомі трансгенні миші або щури, здатні продукувати повністю людські однодоменні антитіла. Див., наприклад, US20090307787A1, в патенті США № 8754287, US20150289489A1, US20100122358A1 і WO2004049794.

Антитіла людини можна одержати шляхом введення імуногену трансгенних тварин, модифікованому з метою надання йому можливості продукувати інтактні антитіла або інтактні антитіла, що містять варіабельні області людини, у відповідь на введення антигену. Такі

тварини зазвичай містять всі або частину локусів імуноглобулінів людини, які замінюють ендogenousні локуси імуноглобулінів, або які наявні поза хромосомами, або інтегруються випадковим чином в хромосоми тварини. У таких трансгенних мишей ендogenousні локуси імуноглобулінів зазвичай інактивують. Огляд способів одержання антитіл людини з використанням трансгенних тварин можна див. В Lonberg, Nat. Biotech. 23: 1117-1125 (2005). Див. також, наприклад, в патентах США №№ 6075181 і 6150584, в яких описана методика XENOMOUSE™; в патенті США № 5770429, в якому описана методика HUMAB®; в патенті США № 7041870, в якому описана методика K-M MOUSE®, і в публікації патентної заявки США № US 2007/0061900, в якій описана методика VELOCIMOUSE®. Варіабельні області людини з інтактних антитіл, що генеруються такими тваринами, можна додатково модифікувати, наприклад, шляхом об'єднання з іншою константною областю людини.

Антитіла людини також можна одержати за допомогою гібридомних способів. Описано людські мієломні і мишачо-людські гетеромієломні клітинні лінії, які застосовуються для одержання людських моноклональних антитіл. (Див., наприклад, Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); і Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).) Антитіла людини, одержані за допомогою технології на основі В-клітинної гібридомі людини, також описані в Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557-3562 (2006). Додаткові способи включають в себе описані, наприклад, в патенті США № 7189826 (в якому описано одержання моноклональних людських антитіл IgM з гібридомних клітинних ліній) і в публікації Ni, Xiandai Mianyixue, 26 (4): 265-268 (2006) (в якій описані повністю людські гібридомі). Методика людських гібридом (методика Trioma) також описана в Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20 (3): 927-937 (2005), а також в Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27 (3): 185-91 (2005).

Антитіла людини також можна одержати шляхом виділення Fv-клону послідовностей варіабельного домену, вибраних з бібліотек фагового дисплея людського походження. Такі послідовності варіабельного домену можна потім об'єднати з бажаним константним доменом людини. Методики відбору антитіл людини з бібліотек антитіл описані нижче.

Одна методика для одержання послідовностей V_HN, спрямованих проти конкретного антигену або мішені, включає в себе відповідну імунізацію трансгенного ссавця, здатного експресувати антитіла з важким ланцюгом (тобто, з метою посилення імунної відповіді і/або антитіла з важким ланцюгом, спрямованих проти зазначеного антигену або мішені), одержання придатного біологічного зразка від зазначеного трансгенного ссавця, який містить (кодуєчі нуклеотидні послідовності) зазначені послідовності V_HN (такі як зразок крові, зразок сироватки або зразок В-клітин), з подальшою генерацією послідовностей V_HN, спрямованих проти зазначеного антигену або мішені, починаючи з зазначеного зразка, із застосуванням будь-якого придатного способу, по суті відомого в даній галузі техніки (такого як будь-який з описаних в даному документі способів або методика гібридомі). Наприклад, для цієї мети можна використовувати мишей, що експресують антитіла з важким ланцюгом, та інші способи і методики, які описані в WO 02/085945, WO 04/049794 і WO 06/008548 та Janssens et al., Proc. Natl. Acad. Sci. США. 2006 Oct. 10; 103 (41): 15130-5. Наприклад, миші, що експресують антитіла з важким ланцюгом, можуть експресувати антитіла з важким ланцюгом з будь-яким придатним (одиначним) варіабельним доменом, таким як (одиначні) варіабельні домени з природних джерел (наприклад, (одиначні) варіабельні домени людини, (одиначні) варіабельні домени представників сімейства верблюжих або (одиначні) варіабельні домени акули, а також, наприклад, синтетичні або напівсинтетичні (одиначні) варіабельні домени.

5. Антитіла, одержані з бібліотек

Антитіла за даним винаходом можна виділити шляхом скринінгу комбінаторних бібліотек на предмет антитіл, що володіють бажаною активністю або бажаними активностями. Наприклад, в даній галузі техніки відомі різні способи для створення бібліотек фагового дисплея і скринінгу таких бібліотек на антитіла, що володіють бажаними характеристиками зв'язування. Такі способи охарактеризовані, наприклад, в публікації Hoogenboom et al. в Methods in Molecular Biology 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) і додатково описані, наприклад, в публікації McCafferty et al., Nature 348: 552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, в Methods in Molecular Biology 248: 161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338 (2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340 (5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34): 12467-12472 (2004); і Lee et al., J. Immunol. Methods 284 (1-2): 119-132 (2004). Способи конструювання бібліотек однодомених антитіл описані, наприклад, в патенті США № 7371849.

У деяких способах фагових дисплеїв репертуари генів V_H та V_L окремо клонують за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і рекомбінують випадковим чином в фагових бібліотеках, які потім можна піддати скринінгу на антигензв'язуючі фаги, як описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Як правило, фаг відображає фрагменти антитіл або у вигляді одноланцюгових фрагментів Fv (scFv), або у вигляді фрагментів Fab. Бібліотеки, одержані з імунізованих джерел, містять антитіла, що володіють високою афінністю до імуногену, отже, необхідність конструювання гібридом відповідає. В альтернативному варіанті, можна клонувати наївний репертуар (наприклад, людини) для одержання єдиного джерела антитіл до широкого спектру чужорідних антигенів, а також аутоантигенів без імунізації, як описано в публікації Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Нарешті, наївні бібліотеки можна також одержати шляхом синтезу, клонуючи сегменти V-генів стовбурових клітин, які не піддавалися реаранжуванню, і застосовуючи ПЛР-праймери, що містять випадкові послідовності, для кодування гіперваріабельної області CDR3 і здійснення реаранжування *in vitro*, як описано в публікації Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Патентні публікації, в яких описані фаги бібліотеки антитіл людини включають в себе, наприклад, патент США № 5750373 і патентні публікації США №№ 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 і 2009/0002360.

Антитіла або фрагменти антитіл, виділені з бібліотек антитіл людини, в даному документі вважаються антитілами людини або фрагментами антитіл людини.

6. Мультиспецифічні антитіла

У деяких варіантах здійснення даного винаходу запропоноване в даному документі антитіло є мультиспецифічним антитілом, наприклад, біспецифічним антитілом. Мультиспецифічні антитіла є моноклональними антитілами, які містять щонайменше дві різних ділянки специфічного зв'язування. У деяких варіантах здійснення даного винаходу одна зі специфічностей зв'язування є антигеном, вибраним з групи, що складається з CD19, CD20, BCMA і CD38, а інша – є будь-яким іншим антигеном. У деяких варіантах здійснення даного винаходу біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися з двома різними епітопами антигену, вибраного з групи, що складається з CD19, CD20, BCMA і CD38. Біспецифічні антитіла також можна застосовувати для локалізації цитотоксичних агентів в області клітин, які експресують антиген, вибраний з групи, що складається з CD19, CD20, BCMA і CD38.

Біспецифічні антитіла можна одержати у вигляді повнорозмірних антитіл або у вигляді фрагментів антитіл. Способи одержання мультиспецифічних антитіл включають в себе, але не обмежуються ними, рекомбінантну спільну експресію двох пар важкий ланцюг-легкий ланцюг імуноглобуліну з різною специфічністю (див. Milstein and Cuellar, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829 та Trautnecker et al., *EMBO J.* 10: 3655, 1991), і інженерію згідно з принципом "виступ-у-западину" (див., наприклад, патент № 5731168). Мультиспецифічні антитіла також можна одержати шляхом конструювання електростатичних напрямних ефектів для створення Fc-гетеродимерних молекул антитіл (WO 2009/089004A1); перехресного зшивання двох або більшої кількості антитіл або фрагментів (див., наприклад, патент США № 4676980 і Brennan et al., *Science*, 229: 81, 1985); використання лейцінових "блискавок" для одержання біспецифічних антитіл (див., наприклад, Kostelny et al., *J. Immunol.* 148 (5), 1547-1553 (1992)); застосування технології "діатіл" для виготовлення біспецифічних фрагментів антитіл (див., наприклад, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)); і застосування одноланцюгових Fv- (sFv-) димерів (див., наприклад, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)); і одержання триспецифічних антитіл, як описано, наприклад, в публікації Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991); і створення поліпептидів, що містять тандемні однодоменні антитіла (див., наприклад, заявку на патент № 20110028695; and Conrath et al. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276 (10): 7346-50). В даний документ також включено конструювання антитіл з трьома або більшою кількістю функціональних антигензв'язуючих ділянок, включаючи "антитіла-восьминоги" (див., наприклад, US 2006/0025576A1).

7. Варіанти антитіл

У деяких варіантах здійснення даного винаходу розглядаються варіанти амінокислотних послідовностей антитіл, запропонованих в даному документі. Наприклад, може бути бажаним поліпшення афінності та/або інших біологічних властивостей антитіла. Варіанти амінокислотних послідовностей антитіл можна одержати шляхом введення відповідних модифікацій в послідовність нуклеїнових кислот, яка кодує антитіло, або шляхом пептидного синтезу. Такі модифікації містять, наприклад, делеції і/або вставки і/або заміни залишків в амінокислотних послідовностях антитіла. Для одержання кінцевого конструкту можна внести будь-яку комбінацію делецій, вставок і заміни за умови, що кінцевий конструкт володіє бажаними характеристиками, наприклад, зв'язуванням з антигеном.

а) Варіанти заміни, вставок і делецій

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонуються варіанти антитіл, що містять одну або декілька амінокислотних заміни. Ділянки, що представляють інтерес з точки зору замісного мутагенезу, включають в себе HVR і FR. Консервативні заміни наведені в Таблиці 3 під заголовком "переважні заміни". Більш суттєві зміни наведені в Таблиці 3 під заголовком "типові заміни" і детально описані нижче по відношенню до класів бічного ланцюга амінокислот. В антитіло, яке представляє інтерес, можна ввести амінокислотні заміни і досліджувати продукти за допомогою скринінгу на предмет бажаної активності, наприклад, збереження/поліпшення здатності зв'язувати антиген, зниження імуногенності або поліпшення ADCC або CDC.

Таблиця 3.

Амінокислотні заміни

Початковий Залишок	Типові заміни	Переважаючі заміни
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Амінокислоти можна згрупувати за загальними властивостями бічного ланцюга:

- (1) гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотні: Asp, Glu;
- (4) основні: His, Lys, Arg;
- (5) залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro;
- (6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміни призводять до заміни представника одного з цих класів на представника іншого класу.

Один тип варіантів, одержаних шляхом заміни, включає заміну одного або більшої кількості залишків гіперваріабельної області батьківського антитіла (наприклад, гуманізовані антитіла або антитіла людини). Як правило, одержаний(і) варіант(и), відібраний(і) для подальшого дослідження, характеризуються модифікаціями (наприклад, поліпшенням) певних біологічних властивостей (наприклад, підвищеною афінністю, зниженою імуногенністю) в порівнянні з батьківським антитілом і/або в значній мірі зберігає певні біологічні властивості батьківського антитіла. Типовий варіант, що одержується шляхом заміни, є антитілом з дозрілою афінністю, яке легко одержати, наприклад, за допомогою методик дозрівання афінності на основі фагового дисплея, наприклад, описаних в даному документі. Якщо коротко, один або більшу кількість залишків HVR мутують і варіантні антитіла піддають фаговому дисплею і скринінгу на предмет конкретної біологічної активності (наприклад, афінності зв'язування).

Модифікації (наприклад, заміни) можна внести в HVR, наприклад, для поліпшення афінності антитіла. Такі модифікації можна внести в "гарячі точки" HVR, тобто, залишки, що кодуються

кодонами, які в процесі соматичного дозрівання піддаються мутаціям з високою частотою (див., наприклад, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179-196 (2008)), та/або SDR (а-CDR), з тестуванням афінності зв'язування одержаного варіанту V_H або V_L . Афінність дозрівання шляхом конструювання і повторного вибору з вторинних бібліотек описана, наприклад, в

5 Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). У деяких варіантах здійснення дозрівання афінності вносять різноманітність в варіабельні гени, вибрані для дозрівання за допомогою одного з ряду способів (наприклад, ПЛР зниженою точності, перетасування ланцюгів або олігонуклеотид-спрямованого мутагенезу). Потім створюють вторинну бібліотеку. Після цього бібліотеку піддають скринінгу

10 для виявлення варіантів антитіла з бажаною афінністю. Ще один спосіб внесення різноманітності включає HVR-спрямовані підходи, в яких рандомізують декілька залишків HVR (наприклад, 4-6 залишків одночасно). Залишки HVR, які беруть участь у зв'язуванні антигену, можна специфічно визначити, наприклад, за допомогою мутагенезу з аланіновим скануванням або моделюванням. При цьому мішенями часто є CDR-H3 і CDR-L3.

15 У деяких варіантах здійснення даного винаходу заміни, вставки або делеції можуть виникати в одній або більшій кількості HVR за умови, що такі модифікації по суті не знижують здатність антитіла до зв'язування антигену. Наприклад, в HVR можна ввести консервативні модифікації (наприклад, консервативні заміни, як запропоновано в даному документі), які по суті не знижують афінність. Такі модифікації можуть розташовуватися за межами "гарячих точок" HVR

20 або SDR. У деяких варіантах здійснення варіантних послідовностей V_H , наведених вище, кожна HVR є або не зміненою, або містить не більше однієї, двох або трьох амінокислотних заміни.

Придатний спосіб виявлення залишків або областей антитіла, які можуть бути мішенями для мутагенезу, називається "мутагенезом з аланіновим скануванням", як описано Cunningham and

25 Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. В даному способі виявляють залишок або групу залишків-мішеней (наприклад, заряджених залишків, таких як Arg, Asp, His, Lys і Glu) і заміщають їх нейтральними або негативно зарядженими амінокислотами (наприклад, аланіном або поліаланіном) з метою визначити, чи впливає це на взаємодію антитіла з антигеном. У амінокислотні положення, які характеризуються функціональною чутливістю до початкових заміни, можна вводити додаткові заміни. В альтернативному або додатковому варіанті для виявлення точок контакту між антитілом і антигеном використовують кристалічну структуру комплексу антиген-антитіло. Такі контактні або сусідні з ними залишки можна застосовувати як мішені для заміни, або вони можуть не розглядатися як кандидати для заміни. Варіанти можна піддати скринінгу, щоб визначити, чи володіють вони бажаними властивостями.

35 Вставки в амінокислотну послідовність включають в себе N- і/або C-кінцеві злиття довжиною від одного залишку до поліпептидів, що містять сто або більше залишків, а також вставки одного або множини амінокислотних залишків всередині послідовності. Приклади кінцевих вставок включають в себе антитіло з N-кінцевим метіонільним залишком. Інші вставні варіанти молекули антитіла включають в себе злиття N- або C-кінця антитіла з ферментом (наприклад, для ADEPT) або поліпептидом, що збільшує період напіввиведення антитіла в сироватці.

b) Варіанти глікозилювання

У деяких варіантах здійснення даного винаходу запропоноване в даному документі антитіло модифікують з метою збільшення або зменшення ступеня глікозилювання антитіла. Додавання або видалення ділянок глікозилювання в антитіло може бути з легкістю здійснено шляхом зміни амінокислотної послідовності, в результаті чого створюється або видаляється одна або більша кількість ділянок глікозилювання.

Якщо антитіло містить Fc-область, можна змінити приєднаний до неї вуглевод. Нативні антитіла, які продукуються клітинами ссавців, як правило, містять розгалужений двухантенарний олігосахарид, зазвичай приєднаний за допомогою N-зв'язку до Asn297 в CH2-доміні Fc-області. (Див., наприклад, Wright et al. *TIBTECH* 15: 26-32 (1997)). Зазначений олігосахарид може містити різні вуглеводи, наприклад, манозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу і сіалову кислоту, а також фукозу, приєднану до GlcNAc в "стеблі" двухантенарної олігосахаридної структури. у деяких варіантах здійснення даного винаходу можна виконати модифікації олігосахариду в антитілі згідно з винаходом з метою створення варіантів антитіл з

55 визначеними покращеними властивостями.

В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонуються варіанти антитіл, що містять вуглеводну структуру з недостатньою кількістю фукози, приєднаної (безпосередньо чи опосередковано) до Fc-області. Наприклад, кількість фукози в такому антитілі може становити від 1 % до 80 %, від 1 % до 65 %, від 5 % до 65 % або від 20 % до 40 %. Кількість фукози визначають шляхом розрахунку середньої кількості фукози у вуглеводному ланцюзі при Asn297

60

по відношенню до суми всіх вуглеводних структур, приєднаних до Asn 297 (наприклад, складних гібридних структур з високим вмістом манози), виміряного за допомогою MALDI-TOF-мас-спектрометрії, як описано, наприклад, у WO 2008/077546. Asn297 відноситься до залишку аспарагіну, розташованому приблизно в положенні 297 в Fc-області (EU-нумерація залишків Fc-області); проте Asn297 також може розташовуватися на відстані приблизно ± 3 амінокислоти вище або нижче положення 297, тобто між положеннями 294 і 300, через незначну мінливість послідовності антитіл. Такі варіанти фукозилування можуть володіти поліпшеною ADCC-функцією. Див., наприклад, патентні публікації США №№ US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Приклади публікацій, які стосуються "дефукозилування" або "фукозодефіцитних" варіантів антитіла, включають в себе: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Приклади клітинних ліній, які здатні продукувати дефукозилувані антитіла, включають в себе клітини Lec13 CHO, дефектні з фукозилування білка (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); заявка на патент США № 533-545, 1986; US 2003/0157108 і WO 2004/056312 A1, Adams et al., особливо Приклад 11), і клітинні лінії з нокаутом, такі як клітини CHO з нокаутом гену альфа-1,6-фукозилтрансферази FUT8 (див., наприклад, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94 (4): 680-688 (2006); і WO2003/085107).

Крім того, пропонуються варіанти антитіл з олігосахаридами, розділеними навіпіл, наприклад, в яких двухантенарний олігосахарид, приєднаний до Fc-області антитіла, розділений по GlcNAc. Такі варіанти антитіл можуть характеризуватися зниженими фукозилуванням і/або поліпшеною ADCC-функцією. Приклади таких варіантів антитіл описані, наприклад, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); Патент США № 6602684 (Umana et al.); і US 2005/0123546 (Umana et al.). Крім того, запропоновані варіанти антитіл, що містять щонайменше один залишок галактози в складі олігосахариду, приєданого до Fc-області. Такі варіанти антитіл можуть володіти поліпшеною CDC-функцією. Такі варіанти антитіл описані, наприклад, у WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); і WO 1999/22764 (Raju, S.).

с) Варіанти Fc-області

У деяких варіантах здійснення даного винаходу в Fc-область антитіла, запропонованого в даному документі, можна ввести одну або декілька амінокислотних модифікацій, тим самим одержуючи варіант Fc-області. Варіант Fc-області може містити послідовність Fc-області людини (наприклад, Fc-області IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 людини), що містить амінокислотну модифікацію (наприклад, заміну) в одному або більшій кількості амінокислотних положень.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу розглядається варіант антитіла, що володіє деякими, але не всіма ефекторними функціями, що робить його бажаним кандидатом для варіантів застосування, при яких важливий період напіввиведення антитіла *in vivo*, а деякі ефекторні функції (наприклад, комплемент і ADCC) не потрібні або шкідливі. Для підтвердження зниження/ослаблення CDC- і/або ADCC-активності можна виконати аналіз цитотоксичності *in vitro* і/або *in vivo*. Наприклад, щоб переконатися у відсутності зв'язування антитіла з FcγR (і, отже, у відсутності ADCC-активності) при збереженні здатності зв'язування з FcRn можна виконати аналіз зв'язування Fc-рецептора (FcR). Основні клітини, що опосередковують ADCC, NK-клітини, експресують тільки Fc(RIII, в той час як моноцити експресують Fc(RI, Fc(RII і Fc(RIII. Коротка інформація про експресії FcR на гемопоетичних клітинах наведена в Таблиці 3 на сторінці 464 публікації Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991). Обмежуючі приклади аналізу *in vitro* для оцінки ADCC-активності молекули, що представляє інтерес, описані в патенті США № 5500362 (див., наприклад, Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 7059-7063 (1986)) і Hellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 1499-1502 (1985); 5,821,337 (див. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166: 1351-1361 (1987)). В альтернативному варіанті можна використовувати аналізи, не пов'язані з використанням радіоактивних речовин (див., наприклад, аналіз цитотоксичності АСТІ™ для проточної цитометрії без використання радіоактивних речовин (CellTechnology, Inc. Маунтін-В'ю, Каліфорнія, і аналіз цитотоксичності CytoTox 96® без використання радіоактивних речовин (Promega, Медісон, Вісконсін). Як ефекторні клітини в таких аналізах можна застосовувати моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК) і клітини-натуральні кілери (NK). в альтернативному або додатковому варіанті ADCC-активність молекули, що представляє інтерес, можна оцінити *in vivo*, наприклад, на моделі тварини, такої як описано в публікації Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652-656 (1998). Щоб підтвердити, що антитіло не здатне зв'язувати C1q і, отже, не володіє CDC-

активністю, можна провести аналізи зв'язування C1q. (Див., наприклад, аналіз зв'язування C1q і C3c методом ELISA в WO 2006/029879 і WO 2005/100402. Для оцінки активації комплементу можна виконати аналіз CDC (див., наприклад, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101: 1045-1052 (2003); і Cragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103: 2738-2743 (2004)). Крім того, можна визначити зв'язування і виведення/період напіввиведення FcRn in vivo за допомогою способів, відомих в даній галузі техніки (див., наприклад, Petkova, SB et al., Int'l. Immunol. 18 (12): 1759-1769 (2006)).

Антитіла зі зниженою ефекторною функцією включають в себе антитіла з заміною одного або більшої кількості із залишків 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 Fc-області (патент США № 6737056). Такі мутанти Fc включають в себе мутанти Fc з замінами в двох або більшій кількості амінокислотних положень 265, 269, 270, 297 і 327, включаючи так звані мутанти Fc "DANA" з заміною залишків 265 і 297 на аланін (патент США № 7332581).

Описано деякі варіанти антитіл з поліпшенням або зменшенням зв'язуванням з FcR. (Див., наприклад, в № 6737056; WO 2004/056312, і Shields et al., J. Biol. Chem. 9 (2): 6591-6604 (2001).)

У деяких варіантах здійснення даного винаходу варіант антитіла містить Fc-область з однієї або великою кількістю амінокислотних замін, які покращують ADCC (антитілозалежну клітинно-зумовлену цитотоксичність), наприклад, з замінами в положеннях 298, 333 і/або 334 Fc- області (EU-нумерація залишків).

У деяких варіантах здійснення даного винаходу вносять зміни в Fc-область, що призводить до зміни (тобто, поліпшення або зниження) зв'язування C1q і/або комплемент-залежної цитотоксичності (CDC), наприклад, як описано в патенті США № 6194551, WO 99/51642 та Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Антитіла з підвищеним періодом напіврозпаду і поліпшеним зв'язуванням з неонатальним рецептором Fc (FcRn), який відповідає за перенесення материнських IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) та Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)), описані в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Зазначені антитіла містять Fc-область з однієї або більшою кількістю замін, які покращують зв'язування Fc-області з FcRn. Такі варіанти Fc включають в себе ті, які мають заміни в одному або більшій кількості залишків Fc-області: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, заміну залишку 434 Fc-області (патент США № 7371826).

Див. також Duncan & Winter, Nature 322: 738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821; та WO 94/29351 щодо інших прикладів варіантів Fc-області.

d) Варіанти антитіл, сконструйовані шляхом введення цистеїну

У деяких варіантах здійснення даного винаходу може бути бажаним одержання антитіл, сконструйованих шляхом введення цистеїну, наприклад, "thioMAb", в яких один або більша кількість залишків антитіла заміщені залишками цистеїну. У конкретних варіантах здійснення даного винаходу заміщені залишки знаходяться в доступних ділянках антитіла. В результаті заміщення зазначених залишків цистеїном в доступних ділянках антитіла розташовуються реакційноздатні тиольні групи, які можна застосовувати для кон'югування антитіла з іншими фрагментами, такими як фрагменти лікарських засобів або фрагменти лінкер-лікарський засіб, з одержанням імуокон'югату, як описано далі в даному документі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу цистеїном можна замінити один або більшу кількість з наступних залишків: A118 (нумерація EU) важкого ланцюга і S400 (нумерація EU) Fc-області важкого ланцюга. Антитіла, сконструйовані шляхом введення цистеїну, можуть бути одержані, як описано, наприклад, в патенті США № 7521541.

e) Похідні антитіл

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло, запропоноване в даному документі, можна додатково модифікувати шляхом введення додаткових небілкових фрагментів, що відомі в даній галузі техніки і легко доступні. Фрагменти, які можна використовувати для дериватизації антитіла, включають в себе, але не обмежуються перерахованим, водорозчинні полімери. Обмежуючі приклади водорозчинних полімерів включають в себе поліетиленгліколь (ПЕГ), співполімери етиленгліколю та пропіленгліколю, карбоксиметилцелюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі-1,3-діоксолан, полі-1,3,6-триоксан, співполімер етилену/малеїнового ангідриду, поліамінокислоти (гомополімери або випадкові співполімери) і декстран або полі(н-вінілпіролідон) поліетиленгліколь, гомополімери пропіленгліколю, співполімери пропіленоксиду/етиленоксиду, поліоксиетильовані поліолі (наприклад, гліцерин), полівініловий спирт і їх суміші, але не обмежуються ними. Пропіоновий альдегід поліетиленгліколю може мати переваги при виробництві через його стабільність у воді. Полімер може мати будь-яку молекулярний вагу і може бути розгалуженим або нерозгалуженим. Число полімерів, приєднаних до антитіла, може

змінюватися, і, в разі приєднання більше одного полімеру, вони можуть являти собою однакові або різні молекули. Як правило, число і/або тип полімерів, що застосовуються для дериватизації, можна визначити з урахуванням факторів, що включають, але не обмежуються перерахованим, конкретні властивості або функції антитіла, що підлягають поліпшенню, незалежно від того, чи буде похідне антитіла застосовуватися в терапії при певних умовах, та ін.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонуються кон'югати антитіла з небілковим фрагментом, які можна вибірково нагрівати за допомогою опромінення. У деяких варіантах здійснення даного винаходу небілковий фрагмент є вуглецевою нанотрубкою (Kam et al., Proc. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). Опромінення може бути здійснено хвилею будь-якої довжини, включаючи, але не обмежуючись перерахованим, довжини хвиль, які не приносять шкоди звичайним клітинам, але нагрівають небілковий фрагмент до температури, при якій клітини, що знаходяться по сусідству з небілковим фрагментом, гинуть.

Способи одержання

Антитіла (такі як однодоменні антитіла), описані в даному документі, можна одержати за допомогою будь-яких способів, відомих в даній галузі техніки, або як описано в даному документі.

Способи одержання однодоменних антитіл описані в літературі. Див., наприклад, Els Pardon et al, Nature Protocol, 2014; 9 (3): 674. однодоменні антитіла (такі як V_{HH}) можна одержати за допомогою способів, відомих в даній галузі техніки, наприклад, шляхом імунізації представників виду верблужих (наприклад, верблюда або лам) і одержання від них гібридом, або шляхом клонування бібліотеки однодоменних антитіл за допомогою методів молекулярної біології, відомих в даній галузі техніки, і подальшого відбору за допомогою ELISA з окремими клонами невідібраних бібліотек або із застосуванням фагового дисплея.

Для рекомбінантного продукування однодоменних антитіл нуклеїнові кислоти, що кодують однодоменні антитіла, виділяють і вставляють в реплікований вектор для подальшого клонування (ампліфікація ДНК) або для експресії. ДНК, що кодує однодоменне антитіло, можна легко виділити і секвенувати за допомогою традиційних способів (наприклад, із застосуванням олігонуклеотидних зондів, здатних специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкий і легкий ланцюг антитіла). Багато таких векторів є доступними. Вибір вектора частково залежить від клітини-господаря, яка буде застосовуватися. Як правило, переважні клітини-господарі мають або прокариотичне, або еукаріотичне (як правило, від ссавців) походження.

1. Поліклональні антитіла

Як правило, рівень поліклональних антитіл підвищується у тварин в результаті множини підшкірних (п/к) або внутрішньочеревних (в/ч) ін'єкцій відповідного антигену і ад'юванту. Може бути корисним кон'югування відповідного антигену з білком, який є імуногеним для видів, що підлягають імунізації, наприклад, гемоцианіном фісурели (KLH), сироватковим альбуміном, бичачим тиреоглобуліном або інгібітором трипсину соєвих бобів із застосуванням біфункціонального або дериватизуючого агента, наприклад, малеїмідобензоїлсульфосукцинімідного ефіру (кон'югування через залишки цистеїну), N-гідроксисукциніміду (через залишки лізину), глутарового альдегіду, бурштинового ангідриду, SOCl_2 , або $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, де R і R_1 є незалежно нижчими алкільними групами. Приклади ад'ювантів, які можуть застосовуватися, включають в себе повний ад'ювант Фрейнда і ад'ювант MPL-TDM (монофосфорил ліпід A, синтетичний дикоріноміколат трегалози). Протокол імунізації може бути вибраний фахівцем в даній галузі техніки без зайвих експериментів.

Тварин імунізують проти антигену, імуногенних кон'югатів або похідних шляхом комбінування, наприклад, 100 мкг або 5 мкг білка або кон'югату (для кроликів або мишей відповідно) з 3 об'ємами повного ад'юванту Фрейнда, з подальшим ін'єкційним внутрішньошкірним введенням розчину в кілька ділянок. Через місяць тваринам вводять бустерну дозу, яка містить від 1/5 до 1/10 початкової кількості пептиду або кон'югату в повному ад'юванті Фрейнда шляхом підшкірної ін'єкції в кілька ділянок. Через сім-чотирнадцять днів у тварин беруть кров і аналізують сироватку на титр антитіл. Тваринам вводять бустерну дозу до досягнення фази плато для титру антитіл. Кон'югати також можна одержати в культурі рекомбінантних клітин у вигляді білкових сполук. Крім того, для посилення імунної відповіді придатні агрегуючі агенти, такі як алюмокалієві галуни.

2. Моноклональні антитіла

Моноклональні антитіла одержують з популяції по суті однорідних антитіл, тобто, з популяції, окремі антитіла в якій є ідентичними, за винятком можливих природних мутацій і/або посттрансляційних модифікацій (наприклад, ізомеризації, амідування), які можуть бути

присутніми в незначних кількостях. Таким чином, модифікатор "моноклональне" вказує на те, що антитіло не є сумішшю окремих антитіл.

Наприклад, моноклональні антитіла можуть бути одержані за допомогою гібридомного методу, вперше описаного Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), або можуть бути одержані за допомогою методів рекомбінантних ДНК (див. в патенті США № 4816567).

При здійсненні гібридомного методу, мишу або іншу підходящу тварину-господаря, наприклад, хом'яка, імунізують, як описано вище, для виділення лімфоцитів, які продукують або здатні продукувати антитіла, які будуть специфічно зв'язувати білок, що використовується для імунізації. В альтернативному варіанті лімфоцити також можуть бути імунізовані *in vitro*. Потім лімфоцити з'єднують з клітинами мієломи із застосуванням придатного агента злиття, такого як поліетиленгліколь, з метою утворенням гібридомної клітини (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986).

Імунізуючий агент зазвичай включає в себе антигенний білок або його варіант злиття. Як правило, якщо клітини людського походження є бажаними, застосовують лімфоцити периферичної крові ("ЛПК"), а якщо є бажаними джерела з ссавців, що не відносяться до людини, застосовують клітини селезінки або клітини лімфатичних вузлів. Потім лімфоцити сполучають з лінією іморталізованих клітин, із застосуванням придатного агента злиття, такого як поліетиленгліколь, з метою утворення гібридомної клітини. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103.

Як правило, лінії іморталізованих клітин є трансформованими клітинами ссавців, зокрема, мієломними клітинами гризунів, бика і людини. Як правило, застосовують лінії клітин мієломи щура або миші. Одержані таким чином гібридомні клітини висівають і вирощують в придатному культуральному середовищі, яке переважно містить одну або декілька речовин, які інгібують ріст або виживання незлитих батьківських клітин мієломи. Наприклад, якщо в батьківських клітинах мієломи відсутній фермент гіпоксантин гуанінфосфорибозилтрансферази (HGPRT або HPRT), культуральне середовище для гібридом зазвичай включатиме в себе гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (середовище HAT), які є речовинами, що перешкоджають росту HGPRT - дефіцитних клітин.

Переважаючими іморталізованими клітинами мієломи є ті, які ефективно зливаються, підтримують стабільний високий рівень продукування антитіл вибраними клітинами, що продукують антитіла, і чутливі до середовища, такого як середовище HAT. Серед них переважними є лінії клітин мієломи миші, наприклад, лінії клітин, одержані з пухлин миші MOPC-21 і MPC-11, доступних у Центрі розподілу клітин Salk Institute, Сан-Дієго, штат Каліфорнія, США, і клітин SP-2 (і їх похідних, наприклад, X63-Ag8-653), доступних в Американській колекції типових культур, Манассас, штат Вірджинія, США. Також описані людські мієломні і мишачо-людські гетеромієломні клітинні лінії, які застосовуються для одержання моноклональних антитіл людини (Kozbor, J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральне середовище, в якому ростуть гібридомні клітини, аналізують на предмет продукування моноклональних антитіл, спрямованих проти антигену. Переважно специфічність зв'язування моноклональних антитіл, які продукуються гібридомними клітинами, визначають за допомогою імунопреципітації або аналізу зв'язування *in vitro*, такого як радіоімуноаналіз (RIA) або твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA).

Культуральне середовище, в якому культивуються гібридомні клітини, можна аналізувати на наявність моноклональних антитіл, спрямованих проти антигену, що представляє інтерес. Переважно афінність зв'язування і специфічність моноклонального антитіла можна визначати за допомогою імунопреципітації або аналізу зв'язування *in vitro*, такого як радіоімуноаналіз (RIA) або твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA). Такі методи і аналізи добре відомі в даній галузі техніки. Наприклад, афінність зв'язування можна визначити за допомогою аналізу Скетчарда, описаного Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Після ідентифікації гібридомних клітин, які продукують антитіла бажаної специфічності, афінності і/або активності, клони можна субклонувати, застосовуючи процедури граничного розведення і вирощування за допомогою стандартних методів (Goding, вище). Придатні для цієї мети культуральні середовища включають в себе, наприклад, середовище D-MEM або середовище RPMI-1640. Крім того, гібридомні клітини можна вирощувати *in vivo* у вигляді пухлин у ссавців.

Моноклональні антитіла, що секретуються субклонами, відповідно відокремлюють від культурального середовища, асцитної рідини або сироватки за допомогою звичайних процедур очищення імуноглобулінів, таких як, наприклад, білок А-сефароза, гідроксилапатитова хроматографія, гель-електрофорез, діаліз або афінна хроматографія.

Моноклональні антитіла також можна одержати за допомогою методів рекомбінантної ДНК, як описано в патенті США № 4816567, як описано вище. ДНК, що кодує моноклональні антитіла, можна легко виділити і секвенувати за допомогою традиційних способів (наприклад, із застосуванням олігонуклеотидних зондів, здатних специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкий і легкий ланцюг антитіл миші). Гібридомні клітини є добрим джерелом такої ДНК. Після виділення ДНК можна помістити в експресійні вектори, які потім трансфікують в клітини-господарі, такі як клітини *E. coli*, клітини COS мавп, клітини яєчника китайського хом'ячка (СНО) або клітини мієломи, які не виробляють білок імуноглобуліну іншим способом, для синтезу моноклональних антитіл в таких рекомбінантних клітинах-господарях. Оглядові статті про рекомбінантні експресії в бактеріях ДНК, що кодують антитіло, включають в себе Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5: 256-262 (1993) і Plickthun, *Immunol. Revs.* 130: 151-188 (1992).

У додатковому варіанті здійснення даного винаходу антитіла можна виділити з фагових бібліотек антитіл, згенерованих за допомогою способів, описаних в публікації McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) і Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 22: 581-597 (1991) описують виділення антитіл миші і людини, відповідно, із застосуванням фагів бібліотек. У наступних публікаціях описано одержання антитіл людини з високою афінністю (діапазон K_m) шляхом перетасування ланцюгів (Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), а також комбінаторне інфікування і рекомбінація *in vivo* як стратегія побудови дуже великих фагових бібліотек (Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Таким чином, ці методи є ефективними альтернативами традиційним методам гібридомі моноклональних антитіл для виділення моноклональних антитіл.

ДНК також можна модифікувати, наприклад, шляхом заміщення гомологічних послідовностей миші кодуючою послідовністю константних доменів важкого і легкого ланцюгів людини (див. В патенті США № 4816567; Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), або шляхом ковалентного сполучення з кодуючим імуноглобуліном всієї або частини кодуючої послідовності неімуноглобулінового поліпептиду. Як правило, такі неімуноглобулінові поліпептиди є заміщеними в константних доменах антитіла або є заміщеними в варіабельних доменах однієї антигензв'язуючої ділянки антитіла з метою створення химерного двовалентного антитіла, що містить одну антигензв'язуючу ділянку, яка має специфічність для антигену, та іншу антигензв'язуючу ділянку, яка має специфічність для іншого антигену.

Моноклональні антитіла, описані в даному документі, можуть бути одновалентними, одержання яких добре відомо в даній галузі техніки. Наприклад, один спосіб включає рекомбінантну експресію легкого ланцюга імуноглобуліну і модифікований важкий ланцюг. Як правило, важкий ланцюг усеїмається в будь-якій точці Fc-області, з метою запобігання зшивання важкого ланцюга. В альтернативних варіантах відповідні залишки цистеїну можуть бути заміщені іншими амінокислотними залишками або видалені з метою запобігання зшивання. Для одержання одновалентних антитіл також придатні способи *in vitro*. Розщеплення антитіл для одержання їх фрагментів, зокрема Fab-фрагментів, можна виконати за допомогою звичайних методів, відомих в даній галузі техніки.

Химерні або гібридні антитіла також можна одержати *in vitro* за допомогою відомих методів, що застосовуються в хімії синтетичних білків, включаючи сполуки, що містять зшиваючі агенти. Наприклад, імунотоксини можуть бути сконструйовані за допомогою реакції дисульфідного обміну або шляхом утворення тіоефірного зв'язку. Приклади придатних реагентів для цієї мети включають в себе імінотіолат і метил-4-меркаптобутірімідат.

3. Рекомбінантне продукування в прокаріотичних клітинах

а) Конструкція вектора

Послідовності полінуклеїнових кислот, які кодують антитіла за даним винаходом, можна одержати за допомогою стандартних рекомбінантних методів. Бажані послідовності полінуклеїнових кислот можна виділити і секвенувати з клітин, які продукують антитіла, таких як гібридомні клітини. В альтернативному варіанті полінуклеотиди можна синтезувати за допомогою синтезатора нуклеотидів або методів ПЛР. Після одержання послідовності, кодує поліпептиди вводять в рекомбінантний вектор, здатний реплікувати і експресувати гетерологічні полінуклеотиди в прокаріотичних господарів. Багато векторів, які доступні і відомі в даній галузі техніки, можна застосовувати для цілей даного винаходу. Вибір придатного вектора буде залежати в основному від розміру нуклеїнових кислот, які повинні бути вставлені в вектор, і конкретної клітини-господаря, яка повинна бути трансформована вектором. Кожен вектор містить різні компоненти, в залежності від його функції (ампліфікація або експресія гетерологічного полінуклеотиду, або і те, і інше) і його сумісності з конкретною клітиною-господарем, в якій він знаходиться. Як правило, компоненти вектора включають в себе наступні елементи, але не обмежуються ними: джерело початку реплікації, ген маркера відбору,

промотор, ділянку зв'язування рибосом (RBS), сигнальну послідовність, вставку з гетерологічною нуклеїновою кислотою і послідовність термінації транскрипції.

У більшості випадків плазмідні вектори, що містять реплікон і контрольні послідовності, які одержані з видів, сумісних з клітиною-хазяїном, застосовують відносно цих господарів. Вектор зазвичай несе ділянку реплікації, а також марковані послідовності, які здатні забезпечити фенотипічний відбір в трансформованих клітинах. Наприклад, *E. coli* зазвичай трансформують із застосуванням pBR322, плазмиди, одержаної з видів *E. coli*. pBR322 містить гени, що кодують стійкість до ампіциліну (Amp) і тетрацикліну (Tet) і, таким чином, забезпечує простий спосіб ідентифікації трансформованих клітин. pBR322, її похідні або інші мікробні плазмиди або бактеріофаг також можуть містити або бути модифікованими, щоб утримувати промотори, які можуть використовуватися мікробним організмом для експресії ендегенних білків. Приклади похідних pBR322, що застосовуються для експресії конкретних антитіл, докладно описані Carter et al., в патенті США № 5648237.

Крім того, вектори фагу, що містять реплікон і контрольні послідовності, які сумісні з мікроорганізмом-господарем, можуть застосовуватися як трансформуючі вектори відносно цих господарів. Наприклад, бактеріофаг, такий як GEM™-11, можна застосовувати при створенні рекомбінантного вектора, який може застосовуватися для трансформації сприйнятливих клітин-господарів, таких як *E. coli* LE392.

Експресуючий вектор згідно з винаходом може містити дві або більшу кількість пар "промотор-цистрон", що кодують кожен з поліпептидних компонентів. Промотор є нетрансльованою регуляторною послідовністю, розташованою проти ходу транскрипції (5') до цистрону, який модулює його експресію. Як правило, прокаріотичні промотори зазвичай діляться на два класи, індуковані і конститутивні. Індукований промотор є промотором, який зумовлює підвищення рівнів транскрипції цистрону під своїм контролем у відповідь на зміни умов культивування, наприклад, наявності або відсутності поживної речовини або зміна температури.

Відома велика кількість промоторів, які розпізнаються різними потенційними клітинами-господарями. Вибраний промотор може бути функціонально зв'язаний з цистронною ДНК, яка кодує легкий або важкий ланцюг, шляхом видалення промотору з початкової ДНК за допомогою розщеплення рестрикційним ферментом і введенням виділеної промоторної послідовності у вектор за даним винаходом. Як нативну промоторну послідовність, так і множину гетерологічних промоторів можна застосовувати для прямої ампліфікації і/або експресії генів-мішеней. У деяких варіантах здійснення даного винаходу застосовують гетерологічні промотори, оскільки вони, як правило, забезпечують більш високий рівень транскрипції і більшу кількість одержуваного експресованого гену-мішені в порівнянні з промотором нативного поліпептиду-мішені.

Промотори, придатні для застосування з прокаріотичними господарями, включають в себе промотор PhoA, системи промоторів галактамази і лактози, систему промоторів триптофану (*trp*) і гібридні промотори, такі як промотор *tac* або *trc*. Однак придатні і інші промотори, які є функціональними в бактеріях (наприклад, інші відомі бактеріальні або фагові промотори). Їх послідовності нуклеїнових кислот опубліковані в літературі, що дозволяє кваліфікованому фахівцю оперативно лігувати їх з цистронами, які кодують цільові легкі і важкі ланцюги (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) за допомогою лінкерів або адаптерів для забезпечення будь-яких необхідних ділянок рестрикції.

В одному аспекті кожен цистрон в рекомбінантному векторі містить компонент сигнальної послідовності секреції, який спрямовує транслокацію експресованих поліпептидів через мембрану. У більшості випадків сигнальна послідовність може бути компонентом вектора або може бути частиною ДНК поліпептиду-мішені, яка вводиться в вектор. Сигнальна послідовність, вибрана для цілей даного винаходу, повинна бути розпізнана і оброблена (тобто, розщеплена сигнальною пептидазою) клітиною-хазяїном. Для прокаріотичних клітин-господарів, що не розпізнають і не обробляють сигнальні послідовності, нативні для гетерологічних поліпептидів, сигнальна послідовність заміщується прокаріотичною сигнальною послідовністю, вибраною, наприклад, з групи, що складається з лужної фосфатази, пеніцилінази, *Ipp* або лідерів термостабільного ентеротоксину II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA і MBP. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сигнальні послідовності, застосовувані в обох цистронах системи експресії, є сигнальними послідовностями STII або їх варіантами.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу продукування антитіл згідно з винаходом може відбуватися в цитоплазмі клітини-господаря і, отже, не вимагає наявності сигнальних послідовностей секреції в кожному цистроні. У деяких варіантах здійснення даного винаходу поліпептидні компоненти, такі як поліпептид, що кодує домен V_H першої антигензв'язуючої

частини, в деяких випадках зливаю з другою антигензв'язуючою частиною, і поліпептид, що кодує домен V_L першої антигензв'язуючої частини, в деяких випадках зливаю з другою антигензв'язуючою частиною, експресують, надають їм складчасту структуру і збирають, тим самим одержуючи функціональні антитіла в цитоплазмі. Визначені штами господаря (наприклад, штами *E. coli* trxB-) забезпечують стан цитоплазми, який є сприятливим для утворення дисульфідних зв'язків, що дозволяє правильно надавати складчасту структуру і збирати експресовані білкові субодиниці. Proba and Pluckthun Gene, 159: 203 (1995).

У даному винаході пропонується система експресії, в якій кількісне співвідношення експресованих поліпептидних компонентів може модулюватися, щоб максимізувати кількість одержуваних секретованих і правильно зібраних антитіл за даним винаходом. Таке модулювання виконується щонайменше частково шляхом одночасного модулювання сили трансляції для поліпептидних компонентів. Один спосіб модулювання сили трансляції описаний в Simmons et al., в патенті США № 5840523. У зазначеному способі застосовуються варіанти області ініціації трансляції (TIR) в цистроні. Для даної TIR може бути створена серія варіантів послідовності амінокислот або нуклеїнових кислот з діапазоном значень сили трансляції, що забезпечує простий спосіб корекції цього фактора для бажаного рівня експресії конкретного ланцюга. Варіанти TIR можуть бути одержані за допомогою звичайних методів мутагенезу, що призводить до змін кодонів, які можуть змінювати амінокислотну послідовність, хоча перевагу надають мовчазні зміни в послідовності нуклеїнових кислот. Зміни в TIR можуть включати в себе, наприклад, зміни в кількості та відстані між послідовностями Shine-Dalgarno поряд зі змінами в сигнальній послідовності. Одним із способів генерації мутантних сигнальних послідовностей є створення "банку кодонів" на початку кодуєної послідовності, який не змінює амінокислотну послідовність сигнальної послідовності (тобто, зміни є мовчати). Це може бути досягнуто шляхом зміни третього нуклеотидного положення кожного кодону; крім того, деякі амінокислоти, такі як лейцин, серин і аргінін, мають декілька перших і других положень, які можуть ускладнити процес створення банку. Цей спосіб мутагенезу докладно описаний в публікації Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4: 151-158.

Переважно, набір векторів генерується з діапазоном значень сили TIR для кожного цистрону в ній. Цей обмежений набір забезпечує порівняння рівнів експресії кожного ланцюга, а також кількість бажаних білкових продуктів при різних комбінаціях значень сили TIR. Значення сили TIR можна проаналізувати шляхом кількісного визначення рівня експресії репортерного гену, як описано детально в Simmons et al. в патенті США № 5840523. На підставі порівняння сили трансляції бажані індивідуальні TIR вибирають для об'єднання в конструкціях експресійного вектора з даного винаходу.

b) Прокаріотичні клітини-господарі.

Прокаріотичні клітини-господарі, придатні для експресії антитіл за даним винаходом, включають в себе архабактерії і еубактерії, такі як грамнегативні або грампозитивні організми. Приклади придатних бактерій включають в себе *Escherichia* (наприклад, *E. coli*), *Bacilli* (наприклад, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, види *Pseudomonas* (наприклад, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* або *Paracoccus*. У деяких варіантах здійснення даного винаходу застосовують грамнегативні клітини. В одному варіанті здійснення даного винаходу клітини *E. coli* застосовують як господарі для даного винаходу. Приклади штамів *E. coli* включають в себе штам W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC Deposit No. 27,325) і його похідні, включаючи штам 33D3, що має генотип W3110 *AphuA* (*AtonA*) *ptr3* *lac* *lq* *lacL8* *AompT* *A* (*nmpc-fepE*) *degP41* *kan^R* (див. В патенті США № 5639635). Також є придатними інші штами та їх похідні, такі як *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* 1 776 (ATCC 31,537) і *E. coli* RV308 (ATCC 31,608). Ці приклади носять скоріше ілюстративний, ніж обмежувачий характер. Способи конструювання похідних будь-яких з вищезазначених бактерій, що мають визначені генотипи, відомі в даній галузі техніки і описані, наприклад, в публікації Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990). Як правило, необхідно вибирати відповідні бактерії з урахуванням відтворюваності реплікону в клітинах бактерії. Наприклад, види *E. coli*, *Serratia* або *Salmonella* можна відповідним чином застосовувати як клітини-господарі, коли для доставки реплікону застосовують добре відомі плазмідні, такі як pBR322, pBR325, pACYC177 або pKN410.

Як правило, клітина-господар повинна виділяти мінімальні кількості протеолітичних ферментів, при цьому в клітинну культуру можуть бути бажано включені додаткові інгібітори протеази.

c) Продукція білків

Клітини-господарі трансформують за допомогою вищеописаних експресійних векторів і культивують в звичайних поживних середовищах, модифікованих, якщо необхідно, для індукування промоторів, відбору трансформантів або ампліфікації генів, що кодують бажані послідовності. Трансформація означає введення ДНК в клітини прокаріотів-господаря, для того, щоб ДНК була реплікована або як поза хромосомний елемент, або за допомогою хромосомного інтегратора. В залежності від застосовуваної клітини-господаря трансформація виконується за допомогою стандартних методів, придатних для таких клітин. Обробку кальцієм із застосуванням хлориду кальцію, як правило, проводять для бактеріальних клітин, які містять суттєві бар'єри клітинної стінки. В іншому способі трансформації застосовують поліетиленгліколь/ДМСО. Ще одним застосовуваним способом є електропорація.

Прокаріотичні клітини, що застосовуються для одержання антитіл за даним винаходом, вирощують в середовищах, відомих в даній галузі техніки і придатних для культивування вибраних клітин-господарів. Приклади придатних середовищ включають в себе бульйон Лурія (LB) плюс необхідні поживні добавки. У деяких варіантах здійснення даного винаходу середовище також містить селективний агент, вибраний на основі конструкції експресійного вектора, для вибіркового забезпечення росту прокаріотів клітин, що містять експресійний вектор. Наприклад, ампіцилін додають в середовище для росту клітин, які експресують ген резистентності до ампіциліну.

Будь-які необхідні добавки, крім джерел вуглецю, азоту і неорганічних фосфатів, також можуть бути включені до відповідних концентрацій, введені окремо або у вигляді суміші з іншою добавкою або середовищем, наприклад, комплексне джерело азоту. У деяких випадках культуральне середовище може містити один або більшу кількість відновлюють агентів, вибраних з групи, що складається з глутатіону, цистеїну, цистаміну, тіогліколяту, дитіоеритріту і дитіотреїтолу.

Прокаріотичні клітини-господарі культивують при відповідних температурах. Для росту *E. coli*, наприклад, переважна температура коливається від приблизно 20 °C до приблизно 39 °C, більш переважно від приблизно 25 °C до приблизно 37 °C, ще більш переважно становить приблизно 30 °C. Показник рН середовища може бути будь-яким показником рН в межах від приблизно 5 до приблизно 9, в залежності, головним чином, від організму-господаря. Для *E. coli*, рН переважно становить від приблизно 6,8 до приблизно 7,4, а більш переважно – приблизно 7,0.

Якщо індукований промотор застосовується в експресійному векторі за даним винаходом, експресія білка активується в умовах, придатних для активації промотору. В одному аспекті даного винаходу PhoA-промотори застосовують для контролю транскрипції поліпептидів. Відповідно, трансформовані клітини-господарі культивують в фосфатно-обмежуючому середовищі для індукції. Переважно, фосфатно-фосфатно-обмежуюче середовище є середовищем C.R.A.P (див., наприклад, Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263: 133-147). Як відомо в даній галузі техніки, згідно із застосовуваною векторною конструкцією можна застосовувати безліч інших індукторів.

Експресовані антитіла за даним винаходом секретуються в периплазму клітин-господарів і витягуються з неї. Витягування білка зазвичай передбачає руйнування мікроорганізму, як правило, за допомогою таких способів, як осмотичний шок, обробка ультразвуком або лізис. Відразу після руйнування клітин клітинний дебрис або цілі клітини можна одержати за допомогою центрифугування або фільтрації. Білки можна додатково очистити, наприклад, за допомогою афінної хроматографії зі смолою. В альтернативному варіанті білки можна переносити в культуральне середовище і виділяти з нього. Клітини можна видаляти з культури, а супернатант культури – фільтрувати і концентрувати для подальшого очищення одержаних білків. Експресовані поліпептиди можна додатково виділити та ідентифікувати за допомогою загальновідомих способів, таких як електрофорез в поліакриламідному гелі (PAGE) і вестерн-блот аналіз.

В альтернативному варіанті білки продукують у великій кількості за допомогою процесу ферментації. Для продукування рекомбінантних білків доступні різні великомасштабні процедури ферментації з періодичним підживленням. Великомасштабні процеси ферментації характеризуються ємністю щонайменше 1000 літрів, переважно від 1000 до 100.000 літрів. Ці ферментери оснащені лопатевими мішалками для розподілу кисню і поживних речовин, особливо глюкози (переважне джерело вуглецю/енергії). Як правило, маломасштабний процес ферментації передбачає ферментацію у ферментері, об'єм якого не перевищує приблизно 100 літрів, а може складати від приблизно 1 літра до приблизно 100 літрів.

Під час процесу ферментації індукцію експресії білка зазвичай починають після вирощування клітин у відповідних умовах до бажаної густини, наприклад, OD550 з приблизно

180-220, при якій клітини знаходяться в ранній стаціонарній фазі. Як відомо в даній галузі техніки і описано вище, згідно із застосовуваною векторною конструкцією, можна застосовувати безліч індукторів. Клітини можна вирощувати протягом більш коротких періодів перед індукцією. Як правило, клітини індукують протягом приблизно 12-50 годин, хоча період часу індукції може бути довший або коротший.

З метою збільшення кількості та підвищення якості продукованих антитіл за даним винаходом, можна модифікувати різні умови ферментації. Наприклад, щоб поліпшити правильне складання секретованих поліпептидів, для спільного трансформування прокаріотичних клітин-господарів можна застосовувати додаткові вектори, надекспресуючі білки-шаперони, такі як білки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD і DsbG) або FkpA (пептидилпроліліс, транс-ізомерази з шапероновою активністю). Продемонстровано, що білки-шаперони сприяють правильному складанню і розчинності гетерологічних білків, що продукуються в бактеріальних клітинах-господарях. Chen et al. (1999) J Bio Chem 274: 19601-19605; Georgiou et al., венті США № 6083715; Georgiou et al., венті США № 6027888; Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39: 199-210.

Щоб звести до мінімуму протеоліз експресованих гетерологічних білків (особливо тих, які є протеолітично чутливими), для даного винаходу можна застосовувати деякі штами клітин-господарів з дефіцитом протеолітичних ферментів. Наприклад, штами клітин-господарів можна модифікувати для здійснення генетичної(их) мутації(й) в генах, що кодують відомі бактеріальні протеази, такі як протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI і їх комбінації. Деякі протеазодефіцитні штами E. coli доступні і описані, наприклад, в Joly et al. (1998), вище; Georgiou et al., в патенті США № 5264365; Georgiou et al., в патенті США № 5508192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2: 63-72 (1996).

Штами E. coli з дефіцитом протеолітичних ферментів і трансформовані плазмідами, які надекспресують один або більшу кількість шаперонових білків, можна застосовувати як клітини-господарі в системі експресії, яка кодує антитіла за даним винаходом.

d) Очищення білка

Одержані антитіла додатково очищують для одержання препаратів, які по суті є гомогенними для подальшого аналізу і застосування. Можна застосовувати стандартні способи очищення білка, відомі в даній галузі техніки. Наступні процедури є типовими придатними процедурами очищення: фракціонування на імуноафінних або іонообмінних колонках, осадження етанолом, ВЕРХ (методом вискоєфективної рідинної хроматографії) з оберненою фазою, хроматографії на діоксиді кремнію або на катіонообмінній смолі, такий як DEAE, хроматофокусування, ДСН-ПААГ-електрофорез, осадження сульфатом амонію і гель фільтрація із застосуванням, наприклад, Sephadex G-75.

В одному аспекті білок А, іммобілізований на твердій фазі, застосовують для імуноафінного очищення антитіл, що містять Fc-область з даного винаходу. Білок А є білком клітинної стінки 41kD з Staphylococcus aureas, який зв'язується з Fc-областю антитіл з високою афінністю. Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1-13. Тверда фаза, до якої іммобілізований білок А, переважно є колонкою, що містить поверхню скла або діоксиду кремнію, більш переважно контрольовану колонку з пористого скла або колонку з кремнієвою кислотою. У деяких випадках колонку покривали реагентом, таким як гліцерин, з метою запобігання неспецифічній адгезії забруднюючих речовин. Потім тверду фазу промивали для видалення домішок, неспецифічно зв'язаних з твердою фазою. Нарешті, антитіла, що представляють інтерес, витягували з твердої фази шляхом елювання.

4. Рекombінантна продукція в прокаріотичних клітинах

При еукаріотичній експресії компоненти вектора, як правило, включають в себе, але не обмежуються ними, один або більшу кількість з наступних елементів: сигнальну послідовність, джерело початку реплікації, один або більшу кількість маркерних генів та енхансерний елемент, промотор і послідовність термінації транскрипції.

а) Компонент сигнальної послідовності

Вектор для застосування в еукаріотичному господарі може також містити вставку, яка кодує сигнальну послідовність або інший поліпептид, що має специфічну ділянку розщеплення на N-кінці зрілого білка або поліпептиду. Переважно вибрана гетерологічна сигнальна послідовність є такою, яка розпізнається і обробляється (тобто, розщеплюється сигнальною пептидазою) клітиною-хазяїном. Для експресії клітин ссавців доступні сигнальні послідовності ссавців, а також вірусні секреторні лідери, наприклад, сигнал gD простого герпесу.

ДНК такої області попередника лігують в рамці зчитування з ДНК, яка кодує антитіла за даним винаходом.

b) Джерело початку реплікації

Як правило, необхідності в джерелі початку реплікації для експресійних векторів ссавців немає (джерело початку реплікації SV40 зазвичай може застосовуватися тільки тому, що воно містить ранній промотор).

5 c) Компонент гена відбору

Експресійні і клонуючі вектори можуть містити ген відбору, що також називають селектованим маркером. Типові гени відбору кодують білки, які (а) надають стійкість до антибіотиків або інших токсинів, наприклад, ампіциліну, неоміцину, метотрексату або тетрацикліну, (b) доповнюють ауксотрофні дефіцити або (в) постачають критично важливі

10 поживні речовини, недоступні зі складних середовищ, наприклад, ген, який кодує D-аланінову рацемазу для *Bacilli*.

В одному прикладі схеми відбору застосовують препарат для зупинки росту клітини-господаря. Ті клітини, які успішно трансформуються гетерологічним геном, продукують білок, що надає лікарську стійкість, і, таким чином, виживають при режимі відбору. У прикладах такого

15 домінуючого відбору застосовують такі препарати, як неоміцин, мікофенольну кислоту і гігromіцин.

Іншим прикладом придатних селектованих маркерів для клітин ссавців є такі маркери, які дозволяють ідентифікувати клітини, здатні приймати нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіла за даним винаходом, такі як DHFR, тимідинкіназа, металотіонеїн-I та -II, переважно гени

20 металотіонеїну примата, аденозіндезамінази, орнітиндекарбоксилази і т.д.

Наприклад, клітини, трансформовані геном відбору DHFR, спочатку ідентифікують шляхом культивування всіх трансформантів в культуральному середовищі, яке містить метотрексат (Mtx), конкурентний антагоніст DHFR. Відповідна клітина-господар, в разі застосування DHFR дикого типу, є лінією клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO) з дефіцитом активності DHFR

25 (наприклад, ATCC CRL-9096).

В альтернативному варіанті клітини-господарі (зокрема, господарі дикого типу, які містять ендогенну DHFR), трансформовані або спів-трансформовані поліпептид-кодуючими послідовностями ДНК, білок DHFR дикого типу та інший селективний маркер, такий як аміноглікозид 3'-фосфотрансферази (APH), можна вибрати вирощування клітин в середовищі,

30 що містить селективний агент для селектованого маркера, такого як аміноглікозидний антибіотик, наприклад, канаміцин, неоміцин або G418. Див. в патенті США № 4965199.

d) Компонент промотору

Як правило, експресійні і клонуючі вектори містять промотор, який розпізнається організмом-господарем і функціонально зв'язаний з нуклеїною кислотою, яка кодує бажані поліпептидні послідовності. Практично всі еукаріотичні гени мають АТ-збагачену область, розташовану на відстані приблизно 25-30 пар основ проти ходу транскрипції від ділянки, де ініціюється транскрипція. Інша послідовність, що розташована на відстані приблизно 70-80 пар основ проти

40 ходу транскрипції від початку транскрипції багатьох генів, є областю CNCAAT, де N може бути будь-яким з нуклеотидів. 3'-кінець більшості еукаріотів є послідовністю AATAAA, яка може бути сигналом для додавання полі-А-хвоста до 3'-кінця кодуючої послідовності. Всі ці послідовності можна вставити в еукаріотичні експресійні вектори.

Інші промотори, придатні для застосування з прокаріотичними господарями, включають в себе промотор *PhoA*, системи промоторів галактамази і лактози, промотор лужної фосфатази, систему промоторів триптофану (*trp*) і гібридні промотори, такі як промотор *tac*. Однак придатні і

45 інші відомі бактеріальні промотори. Промотори для застосування в бактеріальних системах також будуть містити послідовність Shine-Dalgarno (S. D.), функціонально зв'язану з ДНК, яка кодує антитіла.

Транскрипцію поліпептиду з векторів в клітинах-господарях ссавців контролюють, наприклад, за допомогою промоторів, одержаних з геномів вірусів, таких як вірус полііоми, вірус віспи курей, аденовірус (наприклад, аденовірус 2), вірус папіломи великої рогатої худоби, вірус саркоми птахів, цитомегаловірус, ретровірус, вірус гепатиту В і найбільш переважно вірус мавп 40 (SV40), з гетерологічних промоторів ссавців, наприклад, промотору актину або промотору імуноглобуліну, з промоторів білків теплового шоку, за умови, що такі промотори сумісні з системами клітин-господарів.

Ранні та пізні промотори вірусу SV40 зазвичай одержують у вигляді рестрикційного фрагмента SV40, який також містить вірусне джерело початку реплікації SV40. Безпосередній ранній промотор цитомегаловірусу людини зазвичай одержують у вигляді рестрикційного фрагмента HindIII E. Система для експресії ДНК у господарів ссавців із застосуванням вірусу папіломи великої рогатої худоби у вигляді вектора описана в патенті США № 4419446.

60 Модифікація цієї системи описана в патенті США № 4601978. Див. також публікацію Reyes et al.,

Nature 297: 598-601 (1982) стосовно експресії кДНК інтерферону людини в клітинах миші під контролем промотору тімідин-кінази з вірусу простого герпесу. В альтернативному варіанті як промотор можна застосовувати довгий кінцевий повтор вірусу саркоми Рауса.

е) Компонент елемента енхансера

Транскрипцію ДНК, яка кодує антитіла за даним винаходом, у вищих еукаріотів, часто підвищують шляхом введення енхансерної послідовності в вектор. В даний час відомо багато енхансерних послідовностей з генів ссавців (глобін, еластаза, альбумін, α -фетопротейн та інсулін). Однак, як правило, можна застосовувати енхансер від вірусної еукаріотичної клітини. Приклади включають в себе енхансер SV40 на "пізній" стороні точки початку реплікації (100-270 п.о.), Цитомегаловірусний енхансер раннього промотору, поліомавірусний енхансер на "пізній" стороні точки початку реплікації і аденовірусні енхансери. Див. також публікацію Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) стосовно енхансерних елементів для активації еукаріотичних промоторів. Енхансер може бути сплайсований у вектор в положенні 5' або 3' в поліпептиді, який кодує послідовність, але переважно розташований на ділянці 5' від промотору.

ф) Компонент термінації транскрипції

Експресійні вектори, що застосовуються в клітині-господарях (дріжджі, гриби, комахи, рослини, тварини, людські або зародкові клітини з інших багатоклітинних організмів) також будуть містити послідовності, необхідні для термінації транскрипції і для стабілізації мРНК. Такі послідовності зазвичай доступні з 5'- і, іноді, 3'-нетрансльованих областей еукаріотичних або вірусних ДНК або кДНК. Ці області містять нуклеотидні сегменти, що транскрибуються у вигляді поліаденільованих фрагментів у нетрансльованій частині мРНК, яка кодує поліпептид. Одним з придатних компонентів термінації транскрипції є область поліаденілювання гормону росту великої рогатої худоби. Див. Публікацію WO94/11026 і описаний в ній експресійний вектор.

г) Відбір і трансформація клітин-господарів

Придатні клітини-господарі для клонування або експресії ДНК в описаних в даному документі векторах включають в себе вищі еукаріотні клітини, описані в даному документі, включаючи клітини-господарі хребетних. Вирощування клітин хребетних в культурі (культурі тканин) стало звичайною процедурою. До прикладів придатних клітинних ліній ссавців як клітини-господарі відносяться лінія клітин CV1 нирок мавпи, трансформована SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); лінія ембріональних клітин нирок людини (клітини 293 або клітини 293, субклоновані для росту в суспензійній культурі, які описані в публікації Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); клітини нирок дитинча хом'яка (BHK, ATCC CCL 10); клітини яєчника китайського хом'яка/DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); клітини сертолі миші (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251, 1980); клітини нирок мавпи (CV1 ATCC CCL 70); клітини нирок африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1 587); клітини цервікальної карциноми людини (HELA, ATCC CCL 2); клітини нирок собак (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки щура лінії Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клітини легенів людини (W138, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (Hep G2, HB 8065); пухлини молочної залози миші (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI-клітини (Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); клітини MRC-5; клітиним FS-4; і лінії гепатоми людини (Hep G2).

Клітини-господарі трансформують за допомогою вищеописаних експресійних або клонуючих векторів для продукування антитіл і культивують в звичайних поживних середовищах, модифікованих, якщо необхідно, для індукування промоторів, відбору трансформантів або ампліфікації генів, які кодують бажані послідовності.

h) Культивування клітин-господарів

Клітини-господарі, які застосовуються для продукування антитіл за даним винаходом, можна культивувати в різних середовищах. Для культивування клітин-господарів придатні комерційно доступні середовища, такі як Ham's F10 (Sigma), мінімальне поживне середовище (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) і середовище Голка в модифікації Дульбекко ((DMEM), Sigma). Крім того, будь-яке середовище, описане в публікації Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), в патенті США № 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; або 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; або в патенті США Re30985, можна застосовувати як культуральне середовище для клітин-господарів. Будь-яке з цих середовищ може бути збагачене в міру необхідності гормонами і/або іншими факторами росту (такими як інсулін, трансферин або епідермальний фактор росту), солями (такими як хлорид натрію, солями кальцію, магнію і фосфатами), буферами (такими як HEPES), нуклеотидами (такими як аденозин і тімідин), антибіотиками (такими як препарат ГЕНТАМІЦИНУ™), мікроелементами (визначеними як неорганічні сполуки, зазвичай присутні в кінцевих концентраціях в мікромольному діапазоні), а також глюкозою або еквівалентним джерелом енергії. Будь-які інші необхідні добавки також можуть бути включені у відповідних концентраціях, які будуть відомі

фахівцям в даній галузі техніки. Умови культивування, такі як температура, pH тощо, є такими, які раніше застосовувалися з клітиною-хазяїном, відібраною для експресії, і будуть очевидні для звичайного кваліфікованого фахівця в даній галузі техніки.

i) Очищення білка

При застосуванні рекомбінантних методів, антитіла можна одержати внутрішньоклітинно, в периплазмі або безпосередньо секретувати в середовище. Якщо антитіло продукується внутрішньоклітинно, на першому етапі частинки дебрису, або клітини-господаря, або лізовані фрагменти видаляються, наприклад, шляхом центрифугування або ультрафільтрації. Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) описує процедуру виділення антитіл, які секретуються в периплазму *E. coli*. Якщо коротко, клітинну суспензію розморожують в присутності ацетату натрію (pH 3,5), EDTA і фенілметилсульфонілфториду (PMSF) протягом приблизно 30 хв. Клітинний дебрис можна видалити за допомогою центрифугування. Коли антитіло секретується в середовище, супернатант з таких систем експресії, як правило, спочатку концентрують за допомогою комерційно доступного фільтра для концентрації білка, наприклад, ультрафільтраційної установки Amicon або Millipore Pellicon. З метою інгібування протеолізу на будь-якому з перерахованих вище етапів можна застосовувати інгібітор протеази, такий як PMSF, крім того, для запобігання зростанню випадкових контамінуючих агентів можна застосовувати антибіотики.

Композицію білка, одержану з клітин, можна очистити за допомогою, наприклад, гідроксипатитової хроматографії, гель-електрофорезу, діалізу і афінної хроматографії, причому переважною методикою очищення є афінна хроматографія. Придатність білка А як афінного ліганду залежить від виду та ізотипу будь-якого Fc-домену імуноглобуліну, який присутній в антитілі. Білок А можна застосовувати для очищення антитіл, які є похідними від імуноглобулінів людини, містять 1, 2 або 4 важкі ланцюги (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). Білок G рекомендується для всіх ізотипів миші і для людини 3 (Guss et al., *EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). Матриця, до якої приєднано афінний ліганд, найчастіше є агарозною, але доступні і інші матриці. Механічно стабільні матриці, такі як контрольоване пористе скло або полі(стирол-дивініл) бензол, дозволяють прискорити швидкість потоку і скоротити час обробки, в порівнянні з агарозною матрицею. Якщо антитіло містить домен C_H3, для очищення, придатною є смола Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Філіпсбург, штат Нью-Джерсі). В залежності від антитіла, що підлягає вилученню, доступні також інші методи очищення білка, такі як фракціонування на іонообмінній колонці, осадження етанолом, BEPX з оберненою фазою, хроматографія на діоксиді кремнію, хроматографія на гепарині SEPHAROSE™, хроматографія на аніонній або катіонообмінній смолі (такий як колонка з поліаспарагіновою кислотою), хроматофокусування, ДСН-ПААГ-електрофорез і осадження сульфатом амонію.

Після будь-якого(их) етапу(ів) попереднього очищення суміш, яка містить антитіло, що цікавить, і контамінуючі агенти, може бути піддана хроматографії з гідروفобною взаємодією з низьким pH із застосуванням буфера для елюювання при pH між приблизно 2,5-4,5, переважно при низьких концентраціях солей (наприклад, від приблизно 0-0,25M солі).

Імунокон'югати

У деяких варіантах здійснення даного винаходу також пропонуються імунокон'югати, що містять будь-яке з антитіл (наприклад, однодоменні антитіла), описаних в даному документі, кон'югованих з одним або більшою кількістю цитотоксичних агентів, наприклад, хіміотерапевтичними засобами або лікарськими речовинами, інгібіторами росту, токсинами (наприклад, білковими токсинами, токсинами бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, що володіють ферментативною активністю, або їх фрагмента і/або радіоактивними ізотопами).

У деяких варіантах здійснення даного винаходу імунокон'югат є кон'югатом антитіло-лікарський засіб (ADC), в якому антитіло кон'юговане з одним або більшою кількістю лікарських засобів, включаючи, але не обмежуючись ними, майтансиноїд (див. в патентах США №№ 5202020, 5416064 та в Європейському патенті EP 0 425 235 B1); аурістатін, наприклад, фрагменти лікарського засобу монометилаурістатину DE і DF (MMAE і MMAF) (див. в патентах США №№ 5635483 і 5780588, а також 7498298); доластатін; каліхеаміцин або його похідне (див. в патентах США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 та 5877296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53: 3336-3342 (1993); і Lode et al., *Cancer Res.* 58: 2925-2928 (1998)); антрациклін, такий як дауноміцин або доксорубіцин (див. Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13: 477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16: 358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16: 717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12: 1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:

4336-4343 (2002); і патент США № 6630579); метотрексат; віндезін; таксан, такий як доцетаксел, паклітаксел, ларотаксел, тезетаксел і ортатаксел; тріхотецен; а також CC1065.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу імунокон'югат містить антитіло, як описано в даному документі, яке кон'юговане з ферментативно активним токсином або його фрагментом, включаючи, але не обмежуючись ними, ланцюг А дифтерійного токсину, незв'язувальні активні фрагменти дифтерійного токсину, ланцюг А екзотоксину (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модексину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантини, білки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *Saponaia officinalis*, гелонін, ітогеллін, рестріктоцин, феноміцин, еноміцин або трікотецени.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу імунокон'югат містить антитіло, як описано в даному документі, яке кон'юговане з радіоактивним атомом з утворенням радіокон'югату. Для одержання радіокон'югатів доступні різноманітні радіоактивні ізотопи. Приклади включають в себе At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} та радіоактивні ізотопи Lu. У разі, якщо радіокон'югат застосовують для виявлення, він може містити радіоактивний атом для скінтиграфічних досліджень, наприклад, ^{99m}Tc або ^{112}In , або спінову мітку, що застосовується для візуалізації ядерного магнітного резонансу (ЯМР) (також відомого як магнітно-резонансна томографія, МРТ), таку як, знову ж таки, йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

Кон'югати антитіла і цитотоксичного агента можуть бути одержані із застосуванням множини біфункціональних агентів, що зв'язують білок, таких як N-сукциніміди-3-(2-піридилдітіо) пропіонат (SPDP), сукциніміди-4- (N-малеїмідометил) циклогексан-1 карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні імідоефірів (такі як диметиладипімідат HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідил суберат), альдегіди (такі як глутаровий альдегід), біс-азідосполуки (такі як біс (п-азидобензоїл) гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс (п-діазонійбензоїл) -етиленамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2, 4-динітробензол). Наприклад, рициновий імунотоксин можна одержати, як описано у Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). 1-ізоціанатбензил-3-метилдиетилентриамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA), мічена вуглецем-14, є типовим хелатуючим агентом для кон'югування радіонуклеотиду з антитілом. Див. WO94/11026. Лінкер може являти собою "розщеплюваний лінкер", який полегшує вивільнення цитотоксичного лікарського засобу в клітині. Наприклад, можна застосовувати кислотну-лабільний лінкер, чутливий до пептидази лінкер, фотолабільний лінкер, диметилловий лінкер або дисульфідвмісний лінкер (Chari et al., Cancer Res. 52: 127-131 (1992); патент США № 5208020).

У даному винаході безумовно передбачається застосування імунокон'югатів або ADC, але без обмеження, наприклад, кон'югатів, одержаних із застосуванням реагентів крос-лінкера, включаючи, але не обмежуючись ними, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC і сульфо-SMPB і SVSB (сукцинімідил- (4-вінілсульфон) бензоат), які є комерційно доступними (наприклад, від компанії Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, штат Іллінойс, США).

Способи та композиції для діагностики та виявлення

У деяких варіантах здійснення даного винаходу будь-яке з антитіл (такі як однодоменні антитіла), описаних в даному документі, є придатним для виявлення наявності відповідного антигену (такого як CD19, CD20, BCMA або CD38) в біологічному зразку. В даному контексті термін "виявлення" охоплює кількісне або якісне виявлення. У деяких варіантах здійснення даного винаходу біологічний зразок є кров'ю, сироваткою або іншим рідким зразком біологічного походження. У деяких варіантах здійснення даного винаходу біологічний зразок включає клітину або тканину.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-CD19 (таке як будь-яке однодоменне антитіло анти-CD19, описане в даному документі) для застосування в способі діагностики або виявлення. У додатковому аспекті пропонується спосіб виявлення наявності CD19 в біологічному зразку. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений спосіб включає виявлення наявності білка CD19 в біологічному зразку. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 є CD19 людини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений спосіб включає приведення в контакт біологічного зразка з антитілом анти-CD19, як описано в даному документі, в умовах, що забезпечують зв'язування антитіла анти-CD19 з CD19, і визначення утворення комплексу антитіла анти-CD19 з CD19. Такий спосіб можна здійснювати in vitro або in vivo. У деяких варіантах здійснення даного

винаходу антитіло анти-CD19 застосовують для вибору суб'єктів, які підходять для лікування за допомогою антитіла анти-CD19, наприклад, якщо CD19 є біомаркером для відбору пацієнтів.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-CD20 (таке як будь-яке однодоменне антитіло анти-CD20, описане в даному документі) для застосування в способі діагностики або виявлення. У додатковому аспекті пропонується спосіб виявлення наявності CD20 в біологічному зразку. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений спосіб включає виявлення наявності білка CD20 в біологічному зразку. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 є CD20 людини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений спосіб включає приведення в контакт біологічного зразка з антитілом анти-CD20, як описано в даному документі, в умовах, що забезпечують зв'язування антитіла анти-CD20 з CD20, і визначення утворення комплексу антитіла анти-CD20 з CD20. Такий спосіб можна здійснювати *in vitro* або *in vivo*. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD20 застосовують для вибору суб'єктів, які підходять для лікування за допомогою антитіла анти-CD20, наприклад, якщо CD20 є біомаркером для відбору пацієнтів.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-BCMA (таке як будь-яке однодоменне антитіло анти-BCMA, описане в даному документі) для застосування в способі діагностики або виявлення. У додатковому аспекті пропонується спосіб виявлення наявності BCMA в біологічному зразку. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений спосіб включає виявлення наявності білка BCMA в біологічному зразку. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA є BCMA людини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений спосіб включає приведення в контакт біологічного зразка з антитілом анти-BCMA, як описано в даному документі, в умовах, що забезпечують зв'язування антитіла анти-BCMA з BCMA, і визначення утворення комплексу антитіла анти-BCMA з BCMA. Такий спосіб можна здійснювати *in vitro* або *in vivo*. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-BCMA застосовують для вибору суб'єктів, які підходять для лікування за допомогою антитіла анти-BCMA, наприклад, якщо BCMA є біомаркером для відбору пацієнтів.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується антитіло анти-CD38 (таке як будь-яке однодоменне антитіло анти-CD38, описане в даному документі) для застосування в способі діагностики або виявлення. У додатковому аспекті пропонується спосіб виявлення наявності CD38 в біологічному зразку. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений спосіб включає виявлення наявності білка CD38 в біологічному зразку. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 є CD38 людини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений спосіб включає приведення в контакт біологічного зразка з антитілом анти-CD38, як описано в даному документі, в умовах, що забезпечують зв'язування антитіла анти-CD38 з CD38, і визначення утворення комплексу антитіла анти-CD38 з CD38. Такий спосіб можна здійснювати *in vitro* або *in vivo*. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD38 застосовують для вибору суб'єктів, які підходять для лікування за допомогою антитіла анти-CD38, наприклад, якщо CD38 є біомаркером для відбору пацієнтів.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується мічені антитіла (такі як однодоменні антитіла анти-CD19, анти-CD20, анти-BCMA або анти-CD38). Мітки включають в себе, але не обмежуються перерахованим, мітки або фрагменти, які можна детектувати безпосередньо (такі як флуоресцентні, хромофорні, електрошільні, хемілюмінесцентні і радіоактивні мітки), а також фрагменти, такі як ферменти або ліганди, які можна детектувати побічно, наприклад, за допомогою ферментативної реакції або молекулярної взаємодії. Типові мітки включають в себе, але не обмежуються перерахованим, радіоізотопи ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H і ^{131}I , флуорофор, такі як рідкоземельні хелати або флуоресцеїн і його похідні, родамін і його похідні, данс, умбелліферон, люциферазу, наприклад, люциферазу світлячка і бактеріальну люциферазу (описана в патенті США № 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофталазіндіони, пероксидазу хрону (HRP), лужну фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамілазу, лізозим, сахаридоксидазу, наприклад, глюкооксидазу, галактооксидазу і глюкоза-6-фосфат дегідрогеназу, гетероциклічні оксидази, такі як уриказа і ксантинооксидаза, приєднані до ферменту, який використовує пероксид водню для окислення попередника барвника, такому як HRP, лактопероксидаза або мікропероксидаза, біотин/авідин, спінові мітки, бактеріофагові мітки, стабільні вільні радикали і т. п.

III. Химерні рецептори антигенів

В одному аспекті даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів (CAR), що містить позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить одне або декілька однодоменних антитіл (таких як V_H). Будь-яке одне однодоменних антитіло, описане в розділі II, можна застосовувати в CAR, описаних в даному документі. Типові CAR, що містять один або більшу кількість доменів V_H (тобто, CAR на основі V_H), проілюстровані і порівнюються зі звичайними

CAR, що містять scFvs (тобто, CAR на основі scFv) на ФІГ. 1A-1D. Фахівцю в даній галузі техніки повинне бути зрозуміло, що домени V_HN в типових CAR на ФІГ. 1A-1D можуть бути замінені іншими sdAb.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів (CAR), що містить поліпептид, який містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить однодоменне антитіло (sdAb), яке специфічно зв'язується з антигеном (таким як пухлинний антиген); (b) трансмембранний домен; і (с) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антиген вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 і гліколіпіду F77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, перший спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є моновалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є полівалентним, наприклад, двовалентним або тривалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є мультиспецифічним, наприклад, біспецифічним.

Химерні рецептори антигенів специфічних мішеней

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонуються CAR, що містять позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить будь-який з описаних в даному документі однодоменних антитіл анти-CD19, анти-CD20, анти-BCMA або анти-CD38. CAR можуть бути моноспецифічними або мультиспецифічними (наприклад, біспецифічні або з більш великим числом специфічностей), а також CAR можуть бути моновалентними або полівалентними (наприклад, двовалентні, тривалентні або більше з більш високим числом валентностей). Перелік типових моноспецифічних химерних антигенних рецепторів, типові послідовності, конструкції і їх вектори наведені в Таблиці 4.

В Таблицях 4, 5 і 6, наведених в розділі "III. Химерний рецептор антигенів" використовуються такі скорочення: Тип.: типовий; Век.: вектор; AA: послідовність амінокислот CAR; NA: послідовність нуклеїнових кислот CAR; СП: сигнальний пептид; Позаклітинний: позаклітинний антигензв'язуючий домен; sdAb: однодоменне антитіло; ТМ: трансмембранний домен; КО1: спів-стимулюючий сигнальний домен 1; КО2: спів-стимулюючий сигнальний домен 2; Перв.: Первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен. Домени перераховані зліва направо в кожному рядку, що відповідає порядку доменів від N-кінця до С-кінця поліпептиду CAR.

1. CD19 CAR

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CAR, націлений на CD19 (також згадується в даному документі як "CD19 CAR"), що містить поліпептид, який містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD19 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між C-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR є моновалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR є мультиспецифічним, наприклад, біспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR є полівалентним, наприклад, двовалентним або тривалентним.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CD19 CAR, що містить поліпептид, який містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD19 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому анти-CD19 sdAb містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb додатково містить FR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 240, FR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 241, FR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 242, та/або FR4, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 243. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між C-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR є моновалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR є мультиспецифічним, наприклад, біспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR є полівалентним, наприклад, двовалентним або тривалентним.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CD19 CAR, що містить поліпептид, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 248. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CD19 CAR, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 248. Також пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 248.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує будь-який CD19 CAR, описаний в даному документі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 250. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота є ДНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є РНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується вектор, що містить будь-яку з нуклеїнових кислот, що кодують CD19 CAR, описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є експресійним вектором. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є вірусним вектором, таким як лентівірусний вектор.

2. CD20 CAR

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CAR, націлений на CD20 (також згадується в даному документі як "CD20 CAR"), що містить поліпептид, який містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD20 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефektorної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR є моновалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 249. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є мультиспецифічним, наприклад, біспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR є полівалентним, наприклад, двовалентним або тривалентним.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CD20 CAR, що містить поліпептид, який містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD20 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому анти-CD20 sdAb містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb додатково містить FR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 244, FR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 245, FR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 246, та/або FR4, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 247. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний

сигнальний домен імунної ефektorної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу

5 спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем

10 трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний

15 домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR є моновалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 249. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є мультиспецифічним, наприклад, біспецифічним. У деяких

20 варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR є полівалентним, наприклад, двовалентним або тривалентним.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CD20 CAR, що містить поліпептид, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності

25 SEQ ID NO: 249. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CD20 CAR, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 249. Також пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 249.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує будь-який CD20 CAR, описаний в даному документі. У деяких варіантах здійснення

30 даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 251. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 251. У деяких варіантах здійснення даного

35 винаходу виділена нуклеїнова кислота є ДНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є РНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується вектор, що містить будь-яку з нуклеїнових кислот, що кодують CD20 CAR, описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є експресійним вектором. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є вірусним вектором, таким як

40 лентівірусний вектор.

3. BCMA CAR

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CAR, націлений на BCMA (також згадується в даному документі як "BCMA CAR"), що містить поліпептид, який містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранний

45 домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефektorної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний

50 сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких

55 варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид

60 містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий

домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD28, перший спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: 5 сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR є моновалентним.

10 У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується BCMA CAR, що містить поліпептид, який містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому анти-BCMA sdAb містить будь-який з наступних елементів:

15 (1) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;

2) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30;

20 3) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31;

4) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність 25 SEQ ID NO: 32;

5) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33;

6) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність 30 SEQ ID NO: 34;

(7) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35;

35 8) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36;

9) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність 40 SEQ ID NO: 37;

10) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38; або

11) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність 45 SEQ ID NO: 39.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з 50 SEQ ID NO: 78-88. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий 55 сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У 60

деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD28, перший спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR є моновалентним.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується BCMA CAR, що містить поліпептид, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності, вибраним з групи, що складається з SEQ ID NO: 152-162 і 257-259. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується BCMA CAR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 152-162 і 257-259. Також пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 152-162 і 257-259.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує будь-який з BCMA CAR, описаних в даному документі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності нуклеїнової кислоти, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 175-185 і 261-263. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 175-185 і 261-263. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є ДНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є РНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується вектор, що містить будь-яку з нуклеїнових кислот, що кодують BCMA CAR, описані вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є експресійним вектором. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є вірусним вектором, таким як лентівірусний вектор.

4. CD38 CAR

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CAR, націлений на CD38 (також згадується в даному документі як "CD38 CAR"), що містить поліпептид, який містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD38 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD38 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефektorної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD28, перший спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α ,

трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 CAR є моновалентним.

5 У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CD38 CAR, що містить поліпептид, який містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD38 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому анти-CD38 sdAb містить будь-який з наступних елементів:

10 (1) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 64;

(2) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65;

15 (3) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66;

(4) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 43; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67;

(5) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68;

25 (6) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 45; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 57; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 69;

(7) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 58; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70;

30 (8) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 59; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 71;

(9) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 60; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 72;

35 (10) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 61; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 73;

(11) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 62; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 74; або

(12) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 63; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75.

45 У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD38 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD38 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 89-100. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між C-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах

здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD28, перший спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 CAR є моновалентним.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CD38 CAR, що містить поліпептид, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 163-174 і 260. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CD38 CAR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 163-174 і 260. Також пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 163-174 і 260.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує будь-який CD38 CAR, описаний в даному документі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності нуклеїнової кислоти, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 186-197 і 264. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 186-197 і 264. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є ДНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є РНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується вектор, що містить будь-яку з нуклеїнових кислот, що кодують CD38 CAR, описаних вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є експресійним вектором. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є вірусним вектором, таким як лентівірусний вектор.

5. CD22 CAR

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CAR, націлений на CD22 (також згадується в даному документі як "CD22 CAR"), що містить поліпептид, який містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD22 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD22 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефektorної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD22 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD22 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD28, перший спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах

здійснення даного винаходу CD22 CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD22 CAR є моновалентним.

Таблиця 4.

Типові моноспецифічні, одновалентні CAR.

Тип. Назва вектору або CAR	Тип. AA SEQ ID	Тип. NA SEQ ID	СП	Позаклітин. sdAb	Шар- нір	ТМ	Внутрішньоклітинна сигналізація		
							КО1	КО2	Перв.
BCMA CAR									
PLVX-hEF1a-269A37346	1152	175	CCD8α	269A37346	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37348	1153	176	CCD8α	269A37348	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37917	1154	177	CCD8α	269A37917	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37355	1155	178	CCD8α	269A37355	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37915	1156	179	CCD8α	269A37915	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37936	1157	180	CCD8α	269A37936	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37953	1158	181	CCD8α	269A37953	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37965	1159	182	CCD8α	269A37965	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37972	1160	183	CCD8α	269A37972	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37353	1161	184	CCD8α	269A37353	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37948	1162	185	CCD8α	269A37948	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
GSI5011 CAR	257	261	CCD8α	269A37346	CD8α	CD8α	CD137	NA	CD3ζ
GSI5019 CAR	258	262	CCD8α	269A37353	CD8α	CD8α	CD137	NA	CD3ζ
GSI5020 CAR	2259	263	CCD8α	269A37917	CD8α	CD8α	CD137	NA	CD3ζ
CD38 CAR									
PLVX-hEF1a-38A37333	1163	186	CCD8α	38A37333	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37336	1164	187	CCD8α	38A37336	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37699	1165	188	CCD8α	38A37699	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37331	1166	189	CCD8α	38A37331	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37717	167	190	CCD8α	38A37717	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37719	168	191	CCD8α	38A37719	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37330	169	192	CCD8α	38A37330	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37334	170	193	CCD8α	38A37334	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37730	171	194	CCD8α	38A37730	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37340	172	195	CCD8α	38A37340	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37731	173	196	CCD8α	38A37731	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ

PLVX-hEF1a-38A37326	174	197	CCD8α	38A37326	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
CD19 V _H H CAR	248	250	CD8α	CD19 V _H H	CD8α	CD28	CD28	NA	CD3ζ
CD20 V _H H CAR	249	251	CD8α	CD20V _H H	CD8α	CD28	CD28	NA	CD3ζ
GSI5012 CAR	260	264	CD8α	38A37717	CD8α	CD8α	CD137	NA	CD3ζ

Полівалентні химерні рецептори антигенів

У даному винаході також пропонуються полівалентні CAR, що мають дві або більшу кількість (наприклад, приблизно 2, 3, 4, 5, 6 або більше) ділянок зв'язування антигену, які містять

5 однокласні антитіла. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR націлений на один антиген і містить дві або більшу кількість ділянок зв'язування для одного антигену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR націлений на

10 більш ніж один антиген, і при цьому полівалентний CAR містить дві або більшу кількість ділянок зв'язування щонайменше для одного антигену. Ділянки зв'язування, специфічні для одного і того ж антигену, можуть зв'язуватися з одним і тим же епітопом антигену або зв'язуватися з різними епітопами антигену. Ділянки зв'язування, специфічні для одного і того ж антигену, можуть містити однакові або різні однокласні антитіла.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний (наприклад, двовалентний, тривалентний або з великим числом валентностей) химерний рецептор

15 антигенів, що містить поліпептид, який містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить множину (наприклад, приблизно 2, 3, 4, 5, 6 або більше) однокласних антитіл (sdAb), які специфічно зв'язуються з антигеном (таким як пухлинний антиген); (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антиген вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 і

20 гліколіпіду F77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу множина sdAb є верблужими, химерними, людськими або гуманізованими. У деяких варіантах здійснення даного винаходу множина однокласних антитіл є злитими один з одним за допомогою пептидних зв'язків або пептидних лінкерів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить

30 первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких

35 варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR є мультиспецифічним, наприклад, біспецифічним.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний (наприклад, двовалентний, тривалентний або з великим числом валентностей) химерний рецептор

50 антигенів, що містить поліпептид, який містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше однокласне антитіло, яке специфічно зв'язується з першим епітопом антигену (такого як пухлинний антиген), і друге однокласне антитіло, яке специфічно зв'язується з другим епітопом антигену; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому перший епітоп відрізняється від другого епітопу. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антиген вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22,

CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 і гліколіпіду F77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb і/або друге sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу першого однодоменне антитіло і друге однодоменне антитіло є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR є мультиспецифічним, наприклад, біспецифічним.

Описані в даному документі полівалентні CAR можуть бути особливо придатні для націлювання на мультимерні антигени за допомогою синергетичного зв'язування різними ділянками зв'язування антигену або для посилення афінності зв'язування або авідності до антигену. Будь-яке з описаних в даному документі однодоменних антитіл, таких як антитіла анти-CD19, анти-CD20, анти-BCMA або анти-CD38, можна застосовувати в позаклітинному антигензв'язуючому домені полівалентних CAR, описаних в даному документі. Перелік типових моноспецифічних полівалентних химерних антигенних рецепторів, їх типових послідовностей, конструкцій і векторів наведено в Таблиці 5.

1. Полівалентний BCMA CAR

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний CAR, націлений на BCMA (також згадується в даному документі як "полівалентний BCMA CAR"), що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить множину (наприклад, 2, 3 або більшу кількість) анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу множина антитіл анти-BCMA sdAb є злитими одне з одним за допомогою пептидних зв'язків або пептидних лінкерів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний BCMA CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний BCMA CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу

зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу

5 полівалентний BCMA CAR є двовалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний BCMA CAR є тривалентним. Для побудови полівалентного BCMA CAR можна застосовувати будь-яке з анти-BCMA sdAb.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний BCMA CAR, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить множину (наприклад, 2, 3 чи

10 більше) анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому анти-BCMA sdAb містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах

15 здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78. У деяких варіантах здійснення даного винаходу множина антитіл анти-BCMA sdAb є злитими одне з одним за допомогою пептидних зв'язків або пептидних лінкерів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5)

20 амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний BCMA CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний BCMA CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD8 α . У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний BCMA CAR є двовалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний BCMA CAR є тривалентним.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний BCMA CAR, що

40 містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше анти-BCMA sdAb і друге анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому перше анти-BCMA sdAb і друге анти-BCMA sdAb специфічно зв'язуються з різними епітопами на BCMA. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше анти-BCMA sdAb розташоване на N-кінці другого анти-BCMA sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше анти-BCMA sdAb розташоване на С-кінці другого анти-BCMA sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше анти-BCMA sdAb і друге анти-BCMA sdAb є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний BCMA CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах

60

здійснення даного винаходу полівалентний ВСМА CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний ВСМА CAR є двовалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний ВСМА CAR є тривалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу позаклітинний антигензв'язуючий домен додатково містить третій анти-BCMA sAb, яке специфічно зв'язується з епітопом, що відрізняється від першого і другого анти-BCMA sAb. Для побудови полівалентного ВСМА CAR можна застосовувати будь-яке з анти-BCMA sAb.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний ВСМА CAR, що містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше анти-BCMA sAb і друге анти-BCMA sAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому перше анти-BCMA sAb містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38; і при цьому друге анти-BCMA sAb містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше анти-BCMA sAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 87. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше анти-BCMA sAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 80. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше анти-BCMA sAb розташоване на N-кінці другого анти-BCMA sAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше анти-BCMA sAb розташоване на С-кінці другого анти-BCMA sAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше анти-BCMA sAb і друге анти-BCMA sAb є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний ВСМА CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний ВСМА CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний ВСМА CAR є двовалентним.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний ВСМА CAR, що містить поліпептид, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності, вибраним з групи, що складається з SEQ ID NO: 198-199 і 265-270. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний ВСМА CAR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 198-199 і 265-270. Також пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 198-199 і 265-270.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка кодує будь-який з полівалентних ВСМА CAR, описаних в даному документі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 198-199 і 265-270.

93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності нуклеїнової кислоти, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 202-203 і 271-276. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 202-203 і 271-276. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є ДНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є РНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується вектор, що містить будь-яку з нуклеїнових кислот, що кодують полівалентні BCMA CAR, описані вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є експресійним вектором. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є вірусним вектором, таким як лентівірусний вектор.

2. Полівалентний CD38 CAR

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний CAR, націлений на CD38 (також згадується в даному документі як "полівалентний CD38 CAR"), що містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить множину (наприклад, 2, 3 або 15 більшу кількість) анти-CD38 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD38 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу множина антитіл анти-CD38 sdAb є злитими одне з одним за допомогою пептидних зв'язків або пептидних лінкерів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD38 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD38 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD38 CAR є двовалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD38 CAR є тривалентним. Для побудови полівалентного CD38 CAR можна застосовувати будь-яке з анти-CD38 sdAb.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний CD38 CAR, що містить: а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить множину анти-CD38 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому кожне з множини анти-CD38 sdAb містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD38 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу кожне з множини анти-CD38 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 93. У деяких варіантах здійснення даного винаходу множина антитіл анти-CD38 sdAb є злитими одне з одним за допомогою пептидних зв'язків або пептидних лінкерів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається

з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD38 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD38 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD38, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD38, трансмембранний домен CD38, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD38 CAR є двовалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD38 CAR є тривалентним.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний CD38 CAR, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше анти-CD38 sdAb і друге анти-CD38 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому перше анти-CD38 sdAb і друге анти-CD38 sdAb специфічно зв'язуються з різними епітопами на CD38. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше анти-CD38 sdAb розташоване на N-кінці другого анти-CD38 sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше анти-CD38 sdAb розташоване на С-кінці другого анти-CD38 sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше анти-CD38 sdAb і друге анти-CD38 sdAb є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD38 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD38 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD38 CAR є двовалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD38 CAR є тривалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу позаклітинний антигензв'язуючий домен додатково містить третій анти-CD38 sdAb, яке специфічно зв'язується з епітопом, що відрізняється від першого і другого анти-CD38 sdAb. Для побудови полівалентного CD38 CAR можна застосовувати будь-яке з анти-CD38 sdAb.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний CD38 CAR, що містить поліпептид, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 200 або SEQ ID NO: 201. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний CD38 CAR, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 200 або SEQ ID NO: 201. Також пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 200 або SEQ ID NO: 201.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує будь-який з полівалентних CD38 CAR, описаних в даному документі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 204 або SEQ ID NO: 205. У деяких варіантах здійснення даного винаходу

пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 204 або SEQ ID NO: 205. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є ДНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є РНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується вектор, що містить

5 будь-яку з нуклеїнових кислот, що кодують полівалентні CD38 CAR, описані вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є експресійним вектором. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є вірусним вектором, таким як лентівірусний вектор.

3. Інші типові полівалентні CAR

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний CAR, націлений на CD19 (також згадується в даному документі як "полівалентний CD19 CAR"), що

10 містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить множину (наприклад, 2, 3 або більшу кількість) анти-CD19 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного

15 винаходу множина антитіл анти-CD19 sdAb є злитими одне з одним за допомогою пептидних зв'язків або пептидних лінкерів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної

20 ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається

25 з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD19 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний

30 CD19 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний

35 сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD19 CAR є двовалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD19 CAR є тривалентним. Для побудови полівалентного CD19 CAR можна застосовувати будь-яке з анти-CD19 sdAb.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний CAR, націлений на CD20 (також згадується в даному документі як "полівалентний CD20 CAR"), що

40 містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить множину (наприклад, 2, 3 або більшу кількість) анти-CD20 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного

45 винаходу множина антитіл анти-CD20 sdAb є злитими одне з одним за допомогою пептидних зв'язків або пептидних лінкерів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної

50 ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається

55 з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD20 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α, розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD20 CAR додатково містить

60 сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У

деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD20 CAR є двовалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD20 CAR є тривалентним. Для побудови полівалентного CD20 CAR можна застосовувати будь-яке з анти-CD20 sdAb.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується полівалентний CAR, націлений на CD22 (також згадується в даному документі як "полівалентний CD22 CAR"), що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить множину (наприклад, 2, 3 або більшу кількість) анти-CD22 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD22 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу множина антитіл анти-CD22 sdAb є злитими одне з одним за допомогою пептидних зв'язків або пептидних лінкерів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефektorної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD22 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD22 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD22 CAR є двовалентним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CD22 CAR є тривалентним.

Таблиця 5.

Типовий моносPECIFICний полівалентний CAR.

CCAR	Тип. AA SEQ ID	Тип. NA SEQ ID	СП	Позаклітинний антигензв'язуючий домен					Шарнір	ТМ	Внутрішньоклітинна сигналізація	
				sdAb #1	Lnk. #1 SEQ ID	sdAb #2	Lnk. #2 SEQ ID	sdAb #3			KO1	Перв.
GSI5014	198	202	CD8α	269A37346	144	269A37346	NA	NA	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5015	199	203	CD8α	269A37346	144	269A37346	144	269A37346	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5016	200	204	CD8α	38A37717	144	38A37717	NA	NA	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5017	201	205	CD8α	38A37717	144	38A37717	144	38A37717	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5021	265	271	CD8α	269A37353	144	269A37917	NA	NA	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5022	266	272	CD8α	269A37353	149	269A37917	NA	NA	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5023	267	273	CD8α	269A37353	151	269A37917	NA	NA	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5024	268	274	CD8α	269A37917	145	269A37353	NA	NA	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5025	269	275	CD8α	269A37917	149	269A37353	NA	NA	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5026	270	276	CD8α	269A37917	150	269A37353	NA	NA	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ

Мультиспецифічний химерний рецептор антигенів

У даному винаході також пропонуються мультиспецифічні химерні рецептори антигенів, націлені на два або більшу кількість (наприклад, на приблизно 2, 3, 4, 5, 6 або більше) різних антигенів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу мультиспецифічний CAR має одну антигензв'язуючу ділянку для кожного антигену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу мультиспецифічний CAR має більше двох ділянок зв'язування щонайменше для одного антигену. Кожна антигензв'язуюча ділянка може містити однодоменне антитіло. Наприклад, в деяких варіантах здійснення даного винаходу мультиспецифічний химерний рецептор антигенів є біспецифічним CAR, що містить позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить два різних sdAb, кожне з яких специфічно зв'язується з антигеном. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR є триспецифічним CAR, що містить позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить три різних sdAb, кожне з яких специфічно зв'язується з антигеном.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується мультиспецифічний (наприклад, біспецифічний) химерний рецептор антигенів (CAR), що містить поліпептид, який містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше однодоменне антитіло (sdAb), яке специфічно зв'язується з першим антигеном (таким як перший пухлинний антиген), і друге однодоменне антитіло (sdAb), яке специфічно зв'язується з другим антигеном (таким як другий пухлинний антиген); (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому перший антиген відрізняється від другого антигену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перший антиген і/або другий антиген вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 і гліколіпіду F77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb і/або друге sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу першого однодоменне антитіло і друге однодоменне антитіло є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефektorної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу мультиспецифічний CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між C-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу мультиспецифічний CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ .

В залежності від бажаного антигену, що є мішенню, CAR за даним винаходом можуть бути сконструйовані так, щоб включати в себе відповідні однодоменні антитіла, які є специфічними для бажаних антигенів. Будь-яке одне або декілька з описаних в даному документі антитіл анти-CD19, анти-CD20, анти-BCMA або анти-CD38 можна застосовувати у позаклітинному антигензв'язуючому домені в CAR згідно з винаходом. Однодоменні антитіла можна розташовувати в будь-якому потрібному порядку. Наприклад, перше однодоменне антитіло з'єднують з N-кінцем або C-кінцем другого однодоменні антитіла. Придатний пептидний лінкер можна розташувати між різними однодоменні антитілами, щоб уникнути стеричної невідповідності між однодоменні антитілами. Перелік типових біспецифічних химерних антигенних рецепторів, їх типових послідовностей, конструкцій і векторів наведено в Таблиці 6.

1. BCMA $\times$ CD38 CAR

У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR за даним винаходом є біспецифічним CAR, який одночасно націлений на BCMA і CD38. Наприклад, BCMA і CD38 можна застосовувати як кандидатів для націлювання антигенів, що експресуються на множині мієломних клітин.

5 У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується мультиспецифічний (наприклад, біспецифічний) химерний рецептор антигенів, націлений на BCMA і CD38 (також згадується в даному документі як "BCMA × CD38 CAR"), що включає в себе поліпептид, який містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше однодоменне антитіло (sdAb), яке специфічно зв'язується з BCMA, і друге однодоменне антитіло, яке специфічно
10 зв'язується з CD38; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb і/або друге sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу першого однодоменне антитіло і друге однодоменне антитіло є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного
15 винаходу перше sdAb є злитим з другим sdAb на N-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb є злитим з другим sdAb на C-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ
20 ID NO: 144-151. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефektorної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний
25 сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких
30 варіантах здійснення даного винаходу BCMA × CD38 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між C-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA × CD38 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення
35 даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується мультиспецифічний
40 (наприклад, біспецифічний) химерний рецептор антигенів, націлений на BCMA і CD38 (також згадується в даному документі як "BCMA × CD38 CAR"), що включає в себе поліпептид, який містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить однодоменне антитіло анти-BCMA і однодоменне антитіло анти-CD38; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому однодоменне антитіло анти-BCMA містить
45 CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18, і CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29; і при цьому антитіло анти-CD38 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68. У деяких варіантах здійснення даного винаходу
50 анти-BCMA sdAb і/або анти-CD38 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD38 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 93. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb і анти-CD38 sdAb є злитими
55 одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb є злитим з анти-CD38 sdAb на N-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше анти-BCMA злино на C-кінці з анти-CD38 sdAb. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У
60 деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну

послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 144-151. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефektorної клітини (такої як Т-клітина). В деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA × CD38 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA × CD38 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується BCMA × CD38 CAR, що містить поліпептид, який містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, однодоменне антитіло анти-CD38, пептидний лінкер, однодоменне антитіло анти-BCMA, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен одержаний з CD8α; при цьому однодоменне антитіло анти-BCMA містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29; і при цьому антитіло анти-CD38 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 144-151. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA × CD38 CAR, містить поліпептид, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності, вибраним з групи, що складається з SEQ ID NO: 207-211. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується BCMA × CD38 CAR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 207-211. Також пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 207-211.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується BCMA × CD38 CAR, що містить поліпептид, який містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, однодоменне антитіло анти-BCMA, пептидний лінкер, однодоменне антитіло анти-CD38, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен одержаний з CD3ζ; при цьому однодоменне антитіло анти-BCMA містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29; і при цьому антитіло анти-CD38 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 144-151. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA × CD38 CAR, містить поліпептид, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності, вибраним з групи, що складається з SEQ ID NO: 212-216. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується BCMA × CD38 CAR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 212-216. Також пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 212-216.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує будь-який з BCMA × CD38 CAR, описаних в даному документі. У деяких варіантах

здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності нуклеїнової кислоти, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 218-227. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 218-227. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є ДНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є РНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується вектор, що містить будь-яку з нуклеїнових кислот, що кодують BCMA × CD38 CAR, описані вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є експресійним вектором. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є вірусним вектором, таким як лентівірусний вектор.

2. CD19 × CD20 CAR

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антигени диференціювання В-клітин, такі як CD19 і CD20, є кандидатами для застосування як антигени-мішені при В-клітинній лімфомі. Застосування деяких з цих антигенів як мішені для пасивної імунотерапії моноклональними антитілами характеризувалося обмеженою ефективністю. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR за даним винаходом є біспецифічним CAR, який одночасно націлений на CD19 і CD20.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується мультиспецифічний (наприклад, біспецифічний) химерний рецептор антигенів, націлений на CD19 і CD20 (також згадується в даному документі як "CD19 × CD20 CAR"), що включає в себе поліпептид, який містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше однодоменне антитіло (sdAb), яке специфічно зв'язується з CD19, і друге однодоменне антитіло, яке специфічно зв'язується з CD20; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb і/або друге sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу першого однодоменне антитіло і друге однодоменне антитіло є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb є злитим з другим sdAb на N-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb є злитим з другим sdAb на C-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 144-151. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 × CD20 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між C-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 × CD20 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується мультиспецифічний (такий як біспецифічний) химерний рецептор антигенів, націлений на CD19 і CD20 (також згадується в даному документі як "CD19 × CD20 CAR"), що включає в себе поліпептид, який містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить однодоменне антитіло анти-CD19 і однодоменне антитіло анти-CD20; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому однодоменне антитіло анти-CD19 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ

ID NO: 2, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; і при цьому антитіло анти-CD20 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb і/або анти-CD20 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb і анти-CD20 sdAb є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 є злитим з анти-CD20 sdAb на N-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше анти-CD19 є злитим з антитілом анти-CD20 sdAb на C-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 146. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефektorної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 × CD20 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між C-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. В деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 × CD20 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CD19 × CD20 CAR, що містить поліпептид, який містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8α, однодоменне антитіло анти-CD19, пептидний лінкер, однодоменне антитіло анти-CD20, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ; при цьому однодоменне антитіло анти-CD19 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; і при цьому антитіло анти-CD20 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 146. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CD19 × CD20 CAR, що містить поліпептид, який характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 206. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CD19 × CD20 CAR, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 206. Також пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 206.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка кодує будь-який CD19 × CD20 CAR, описаний в даному документі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка характеризується щонайменше приблизно 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю до послідовності нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 217. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота є ДНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу виділена нуклеїнова кислота є РНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується вектор, що містить будь-яку з нуклеїнових кислот, що кодують CD19 × CD20 CAR, описані вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є

експресійним вектором. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є вірусним вектором, таким як лентівірусний вектор.

В даний час імунотерапія, націлена на CD19, характеризується високою ефективністю в клінічних дослідженнях. У клінічних дослідженнях короточасного лікування ALL з впливом на CD19 CAR-T-клітини досягається повна ремісії в приблизно 90 % випадків. Однак в приблизно 10 % пацієнтів розвивався рецидив після декількох місяців лікування. Основна причина полягала в тому, що CD19 зникав під час дозрівання В-клітин в плазматичних клітинах, а залишкові пухлинні клітини продукували зниклі варіанти антигену CD19. CD19 × CD20 CAR описані в даному документі, можуть одночасно націлюватися на поверхневі пухлинні антигени CD19 і CD20, які можуть посилювати системну протипухлинну активність Т-клітин та зменшувати частоту феномена "відходу від мішені", який зумовлює щонайменше 30 % рецидивів лейкозу після терапії CAR.

3. Інші типові мультиспецифічні CAR

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується мультиспецифічний (наприклад, біспецифічний) химерний рецептор антигенів, націлений на CD19 і CD22 (також згадується в даному документі як "CD19×CD22 CAR"), що включає в себе поліпептид, який містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить однодоменне антитіло анти-CD19 і однодоменне антитіло анти-CD22; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb і/або анти-CD22 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу першого однодоменне антитіло анти-CD22 і друге однодоменне антитіло анти-CD22 є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є злитим з анти-CD22 sdAb на N-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є злитим з анти-CD22 sdAb на C-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 144-151. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19×CD22 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між C-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19×CD22 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується мультиспецифічний (наприклад, біспецифічний) химерний рецептор антигенів, націлений на CD19 і BCMA (також згадується в даному документі як "CD19×BCMA CAR"), що включає в себе поліпептид, який містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить однодоменне антитіло анти-CD19 і однодоменне антитіло анти-BCMA; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-

CD19 sdAb і/або анти-BCMA sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA і однодоменне антитіло анти-BCMA є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є злитим з анти-BCMA sdAb на N-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є злитим з анти-BCMA sdAb на C-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 144-151. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 $\times$ BCMA CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між C-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 $\times$ BCMA CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3.

Таблиця 6.

Типові біспецифічні CAR.

CAR	Тип. AA SEQ ID	Тип. NA SEQ ID	СП	Позаклітинний антигензв'язуючий домен			Шарнір	ТМ	КО1	Intra.
				sdAb #1	Лінкер SEQ ID	sdAb #2				
CD19 $\times$ CD20	206	217	CD8 α	CD19 V _H H	146	CD20V _H H	CD8 α	CD28	CD28	CD3 ζ
GSI5001	207	218	CD8 α	38A37717	144	269A37346	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GSI5002	208	219	CD8 α	38A37717	145	269A37346	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GSI5003	209	220	CD8 α	38A37717	146	269A37346	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GSI5004	210	221	CD8 α	38A37717	147	269A37346	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GSI5005	211	222	CD8 α	38A37717	148	269A37346	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GSI5006	212	223	CD8 α	269A37346	144	38A37717	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GSI5007	213	224	CD8 α	269A37346	145	38A37717	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GSI5008	214	225	CD8 α	269A37346	146	38A37717	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GSI5009	215	226	CD8 α	269A37346	147	38A37717	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GSI5010	216	227	CD8 α	269A37346	148	38A37717	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ

Позаклітинний антигензв'язуючий домен

Позаклітинний антигензв'язуючий домен CAR, описаний в даному документі, містить одне або декілька (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6 або більше) однодоменних антитіл. Однодоменні

антитіла можуть бути злиті одне з одним безпосередньо за допомогою пептидних зв'язків або за допомогою пептидних лінкерів.

1. Однодоменні антитіла

CAR за даним винаходом містять позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить одне або декілька однодоменних антитіл. SdAbs можуть бути однакового або різного походження і однакового або різного розміру. Типові sdAbs включають в себе, але не обмежуються ними, варіабельні домени важкого ланцюга з антитіл тільки з важким ланцюгом (наприклад, $V_{\text{H}}\text{H}$ або V_{NAR}), що зв'язують молекули, за своєю природою позбавлені легких ланцюгів, одиночні домени (такі як V_{H} або V_{L}), одержані зі звичайних 4-ланцюгових антитіл, гуманізовані антитіла тільки з важким ланцюгом, однодоменні антитіла людини, які продукуються трансгенними мишами або щурами, які експресують сегменти важкого ланцюга людини, а також сконструйовані домени і однодоменні каркаси, відмінні від тих, які одержані з антитіл. Будь-які sdAb, відомі в даній галузі техніки або розроблені авторами винаходу, включаючи однодоменні антитіла, описані в розділі II цієї заявки, можна застосовувати для конструювання CAR, описаних в даному документі. SdAb можуть бути одержані з будь-яких видів, включаючи, але не обмежуючись ними, мишу, щура, людину, верблюда, ламу, міногу, рибу, акул, козу, кролика і бика. Однодоменні антитіла, що розглядаються в даному документі, також включають в себе однодоменні молекули антитіл, що зустрічаються в природі, від інших видів, крім представників сімейства верблюжих і акул.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу sdAb є похідним від однодоменної антигензв'язуючої молекули, що зустрічається в природі, відомої як антитіло з важким ланцюгом, позбавлене легких ланцюгів (також згадується в даному документі як "антитіло тільки з важким ланцюгом"). Такі однодоменні молекули описані в WO 94/04678 і в публікації Hamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363: 446-448, наприклад. Для ясності, варіабельний домен, що є похідним від молекули важкого ланцюга, за своєю природою позбавленої легкого ланцюга, позначається в даному документі як $V_{\text{H}}\text{H}$, щоб можна було відрізнити його від звичайного V_{H} чотириланцюгових імунoglobulinів. Така молекула $V_{\text{H}}\text{H}$ може бути похідною від антитіл, вирощених в організмі представником виду верблюжих, наприклад, верблюда, лами, вікунї, дромадера, альпаки і гуанако. Інші види, крім представників сімейства верблюжих, можуть продукувати молекули важкого ланцюга, які за своєю природою позбавлені легкого ланцюга, причому такі $V_{\text{H}}\text{H}$ входять в обсяг і зміст даного винаходу.

Молекули $V_{\text{H}}\text{H}$ представників сімейства верблюжих є приблизно в 10 разів меншими, ніж молекули IgG. Вони є одиночними поліпептидами і можуть бути дуже стабільними, зберігаючи стійкість до екстремальних значень pH і температури. Більш того, вони можуть бути стійкими до дії протеаз, що не відноситься до звичайних 4-ланцюгових антитіл. Більш того, експресія *in vitro* $V_{\text{H}}\text{H}$ забезпечує високий рівень продукування правильно складених функціональних $V_{\text{H}}\text{H}$. Крім того, антитіла, що виробляються в організмі представників сімейства верблюжих, можуть розпізнавати епітопи, відмінні від тих, які розпізнаються антитілами, що продукуються *in vitro*, шляхом застосування бібліотек антитіл або шляхом імунізації ссавців, що не відносяться до сімейства верблюжих (див., наприклад, WO 9749805). Таким чином, мультиспецифічні або полівалентні CAR, що містять один або більшу кількість доменів $V_{\text{H}}\text{H}$ можуть більш ефективно взаємодіяти з мішенями, ніж мультиспецифічні або полівалентні CAR, що містять антигензв'язуючі фрагменти, одержані зі звичайних 4-ланцюгових антитіл. Оскільки відомо, що $V_{\text{H}}\text{H}$ зв'язуються з "незвичайними" епітопами, такими як западини або борозни, афінність CAR, що включають такі $V_{\text{H}}\text{H}$, може бути більш підходящою для терапевтичного застосування, ніж звичайні мультиспецифічні поліпептиди.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу sdAb є похідним від варіабельної області імунoglobulinу, виявленого у хрящової риби. Наприклад, sdAb може бути похідним від ізотипу імунoglobulinу, відомого як новий рецептор антигенів (NAR), виявлений в сироватці акули. Способи одержання однодоменних молекул, які є похідними від варіабельної області NAR ("IgNAR"), описані в WO 03/014161 і в публікації Streltsov (2005) Protein Sci. 14: 2901-2909.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу sdAb є рекомбінантним, CDR-щепленим, гуманізованим, верблюжим, деімунізованим і/або створеним *in vitro* (наприклад, відібраним за допомогою фагового дисплея). У деяких варіантах здійснення даного винаходу амінокислотну послідовність каркасних областей можна змінити шляхом "зверблюжування" певних амінокислотних залишків в каркасних областях. "Зверблюжування" відноситься до заміни або заміщення одного або більшої кількості амінокислотних залишків в амінокислотній послідовності (що зустрічається в природі) домену V_{H} від звичайного 4-ланцюгового антитіла одним або більшою кількістю амінокислотних залишків, які зустрічаються у відповідному положенні (положеннях) в домені $V_{\text{H}}\text{H}$ антитіла важкого ланцюга. Це може бути виконано за допомогою

способів відомих фахівцям в даній галузі техніки, наприклад, згідно з подальшим описом. Такі "зверблужені" заміни переважно вставляють в положення амінокислот, які утворюють і/або присутні на внутрішній поверхні V_H - V_L , і/або на так званих характерних залишках представників верблужих, як визначено в даному документі (див., наприклад, WO 94/04678, Davies and Riechmann FEBS Letters 339: 285-290, 1994; Davies and Riechmann Protein Engineering 9 (6): 531-537, 1996; Riechmann J. Mol. Biol. 259: 957-969, 1996; і Riechmann and Muyldermans J. Immunol. Meth. 231: 25-38, 1999).

У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне sdAb є однодоменним антитілом людини, що продукується трансгенними мишами або щурами, які експресують сегменти важкого ланцюга людини. Див., наприклад, US20090307787A1, в патенті США № 8754287, US20150289489A1, US20100122358A1 і WO2004049794. У деяких варіантах здійснення даного винаходу sdAb характеризується дозрілою афінністю.

Домени V_H , що зустрічаються в природі, проти конкретного антигену або мішені можна одержати з (наївних або імунних) бібліотек послідовностей V_H представників сімейства верблужих. Такі способи можуть включати чи не включати скринінг такої бібліотеки із застосуванням зазначеного антигену або мішені, або щонайменше однієї частини, фрагмента, антигенної детермінанти або його епітопу за допомогою одного або більшої кількості відомих методів скринінгу. Такі бібліотеки і способи, наприклад, описані в WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 і WO 03/035694. В альтернативних варіантах можна застосовувати поліпшені синтетичні або напівсинтетичні бібліотеки, одержані з (наївних або імунних) бібліотек V_H , таких як бібліотеки V_H , одержані з (наївних або імунних) бібліотек V_H , за допомогою таких методів, як випадковий мутагенез і/або перетасування CDR, як, наприклад, описано в WO 00/43507.

В деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменні антитіла одержують зі звичайних чотириланцюгових антитіл. Див., наприклад, EP 0 368 684, Ward et al. (Nature 1 989 Oct. 12; 341 (6242): 544-6), Holt et al., Trends Biotechnol., 2003 21 (11): 484-490; WO 06/030220; і WO 06/003388.

2. Антигени

Антиген(и), що є мішенню CAR з даного винаходу, є молекулами клітинної поверхні. Однодоменні антитіла можна вибрати для розпізнавання антигену, який функціонує як маркер клітинної поверхні на клітинах-мішенях, асоційованих зі специфічним захворюванням. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антиген (наприклад, перший антиген і/або другий антиген) є пухлинним антигеном. У деяких варіантах здійснення даного винаходу мультиспецифічні CAR націлені на два або більшу кількість пухлинних антигенів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пухлинний антиген асоційований з В-клітинною малігнізацією. Пухлини експресують ряд білків, які можуть виступати як антиген-мішені для імунної відповіді, зокрема імунних відповідей, опосередкованих Т-клітинами. Антигенами-мішенями для CAR, можуть бути антигени, які експресуються на одній ураженій клітині, або антигени, які експресуються на різних клітинах, кожна з яких сприяє розвитку захворювання. Антигени-мішені для CAR можуть безпосередньо або опосередковано брати участь у патогенезі захворювань.

Пухлинні антигени є білками, які продукуються пухлинними клітинами і можуть викликати імунну відповідь, зокрема імунні відповіді, опосередковані Т-клітинами. Вибір антигену-мішені за даним винаходом буде залежати від конкретного типу раку, що підлягає лікуванню. Типові пухлинні антигени включають в себе, наприклад, гліома-асоційований антиген, карциномембріональний антиген (CEA), β -хоріонічний гонадотропін людини, альфафетопротейн (AFP), лектин-реактивний AFP, тіреоглобулін, RAGE-1, MN-CAIX, зворотну транскриптазу теломерази людини, RU1, RU2 (AS), кишкову карбоксиестеразу, mut hsp70-2, M-CSF, простаза, простатспецифічний антиген (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, простейн, PSMA, HER2/neu, сурвівін і теломеразу, пухлинний антиген-1 карциноми простати (PCTA-1), MAGE, ELF2M, нейтрофільну еластазу, ефрінB2, CD22, інсуліновий фактор росту (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I і мезотелін.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пухлинний антиген містить один або більшу кількість антигенних епітопів, асоційованих із злоякісною пухлиною. Злоякісні пухлини експресують ряд білків, які можуть виступати як антигени-мішені для імунної атаки. Ці молекули включають в себе, але не обмежуються ними, тканинспецифічні антигени, такі як MART-1, тирозиназу та gp100 при меланомі і простатичну кислоту фосфатазу (PAP) і простат-специфічний антиген (PSA) при раку передміхурової залози. Інші молекули-мішені належать до групи пов'язаних з трансформацією молекул, наприклад, онкоген HER2/Neu/ErbB-2. Ще одна група цільових антигенів – це онкофетальні антигени, такі як карциномембріональний антиген (CEA). При В-клітинній лімфомі пухлинспецифічний ідіотипний імуноглобулін є по суті

пухлиноспецифічним імуноглобуліновим антигеном, який є унікальним для кожної пухлини. Антигени диференціювання В-клітин, такі як CD 19, CD20 і CD37, є кандидатами для застосування як антигени-мішені при В-клітинній лімфомі.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пухлинний антиген є пухлиноспецифічним антигеном (TSA) або пухлиноасоційованим антигеном (TAA). TSA є унікальним для пухлинних клітин і не зустрічається на інших клітинах в організмі. TAA-асоційований антиген не є унікальним для пухлинної клітини, а, навпаки, експресується на нормальній клітині в умовах, які не викликають стан імунологічної толерантності до антигену. Експресія антигену на пухлини може відбуватися в умовах, які дозволяють імунній системі реагувати на антиген. TAA можуть бути антигенами, які експресуються на нормальних клітинах в період розвитку плоду, коли імунна система є незрілою і нездатна реагувати, або вони можуть бути антигенами, які зазвичай присутні в надзвичайно низьких рівнях на нормальних клітинах, але які експресуються в значно більш високих рівнях на пухлинних клітинах.

Необмежуючі приклади антигенів TSA або TAA включають в себе наступне: Диференціювальні антигени, такі як MART-1/MelanA (MART-I), gp 100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2 і пухлиноспецифічні мультилокальні антигени, такі як MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; надекспресуючі ембріональні антигени, такі як CEA; надекспресуючі онкогени і мутовані гени-супресори пухлинного росту, такі як p53, Ras, HER2/neu; унікальні пухлинні антигени, що виникають в результаті хромосомних транслокацій; такі як BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; і вірусні антигени, такі як антиген EBVA вірусу Епштейна-Барр і антигени вірусу папіломи людини (HPV) E6 і E7. Інші великі білкові антигени включають в себе TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17. 1, NuMa, K-ras, бета-катенін, CDK4, Mum-1, p15, p16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, альфа-фетопротеїн, бета-НCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27. 29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\p1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS 1, SDCCAG16, TA-90\Mac-2 зв'язуючий білок\C-асоційований білок циклофілін, TAAL6, TAG72, TLP і TPS.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антиген (такий як перший антиген і/або другий антиген) вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 і гліколіпіду F77.

3. Пептидні лінкери

Різні однодоменні антитіла в мультиспецифічних або полівалентних CAR, описаних в даному документі, можуть бути злиті один з одним за допомогою пептидних лінкерів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменні антитіла є злитими одне з одним безпосередньо без будь-яких пептидних лінкерів. Пептидні лінкери, що зв'язують різні однодоменні антитіла, можуть бути однаковими або різними. Різні домени CAR також можуть бути злиті один з одним за допомогою пептидних лінкерів.

Кожен пептидний лінкер в CAR може мати однакову або різну довжину і/або послідовність в залежності від структурних і/або функціональних особливостей однодоменних антитіл і/або різних доменів. Кожен пептидний лінкер можна вибрати і оптимізувати незалежно. Довжина, ступінь гнучкості і/або інші властивості пептидного лінкера(-ів), що застосовуються в CAR, можуть чинити певний вплив на властивості, включаючи, але не обмежуючись ними, афінність, специфічність або авідність відносно одного або більшої кількості конкретних антигенів або епітопів. Наприклад, можна вибрати більш довгі пептидні лінкери щоб уникнути стеричної невідповідності між двома розташованими поруч доменами. Наприклад, в полівалентному або мультиспецифічному CAR за даним винаходом, який містить однодоменні антитіла, спрямовані проти мултимерного антигену, довжина і гнучкість пептидних лінкерів переважно такі, що дозволяють кожному однодоменному антитілу в полівалентному CAR зв'язуватися з антигенною детермінантою на кожній з субодиниць мултимера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу короткий пептидний лінкер може бути розташований між трансмембранним доменом і внутрішньоклітинним сигнальним доменом CAR. У визначеному варіанті здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить гнучкі залишки (такі як гліцин і серин), так що розташовані поруч домени вільно переміщуються один відносно одного. Наприклад, гліцин-сериновий дублет може бути придатним пептидним лінкером.

Пептидний лінкер може мати будь-яку придатну довжину. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину щонайменше приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 або більшу кількість амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 100, 75, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7,

6, 5 або менше амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину від приблизно 1 амінокислоти до приблизно 10 амінокислот, від приблизно 1 амінокислоти до приблизно 20 амінокислот, від приблизно 1 амінокислоти до приблизно 30 амінокислот, від приблизно 5 амінокислот до приблизно 15 амінокислот, від приблизно 10 амінокислот до приблизно 25 амінокислот, від приблизно 5 амінокислот до приблизно 30 амінокислот, від приблизно 10 амінокислот до приблизно 30 амінокислот, від приблизно 30 амінокислот до приблизно 50 амінокислот, від приблизно 50 амінокислот до приблизно 100 амінокислот або від приблизно 1 амінокислоти до приблизно 100 амінокислот.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер може мати послідовність, що зустрічається в природі, або послідовність, що не зустрічається в природі. Наприклад, як лінкер можна застосувати послідовність, одержану з шарнірної області антитіл тільки з важким ланцюгом. Див., наприклад, WO1996/34103. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер є гнучким лінкером. Приклади гнучких лінкерів включають гліцинові полімери (G) n, гліцин-серинові полімери (включаючи, наприклад, (GS) n, (GS₂GS) n, (GGGS) n, і (GGGGGS) n, де n є цілим числом щонайменше один), гліцин-аланінові полімери, аланін-серинові полімери та інші гнучкі лінкери, відомі в даній галузі техніки. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність GGGGS (SEQ ID NO: 144), (GGGGGS) 2 (SEQ ID NO: 145), (GGGS) 4 (SEQ ID NO: 146), GGGGS GGGGS₂GGGGGS₂GGGGGS (SEQ ID NO: 147), GGGGS₂GGGGGS₂GGGGGS₂GGGGGS₂GGGGGS (SEQ ID NO: 148), (GGGGGS) 3 (SEQ ID NO: 149), (GGGGGS) 4 (SEQ ID NO: 150), або (GGGGGS) 3 (SEQ ID NO: 151).

Трансмембранний домен

CAR за даним винаходом містять трансмембранний домен, який може бути безпосередньо або опосередковано приєднаний до позаклітинного антигензв'язуючого домену. Трансмембранний домен можна одержати або з природного, або з синтетичного джерела. В даному контексті термін "трансмембранний домен" відноситься до будь-якої білкової структури, яка є термодинамічно стабільною в клітинній мембрані, переважно в мембрані еукаріотичної клітини. Трансмембранні домени, придатні для застосування в CAR, описаних в даному документі, можна одержати з природного білка. В альтернативному варіанті він може бути сегментом синтетичного білка, що не зустрічається в природі, наприклад, гідрофобним білковим сегментом, який є термодинамічно стабільним в клітинній мембрані.

Трансмембранні домени класифікуються на основі тривимірної структури трансмембранного домену. Наприклад, трансмембранні домени можуть утворювати альфа-спіраль, комплекс з більш ніж однієї альфа-спіралі, бета-барель або будь-яку іншу стабільну структуру, здатну охоплювати подвійний фосфоліпідний шар клітини. Крім того, трансмембранні домени можуть також або в альтернативному варіанті класифікуватися на основі топології трансмембранного домену, включаючи кількість проходів, які трансмембранний домен здійснює через мембрану, і орієнтацію білка. Наприклад, однопрохідні мембранні білки один раз перетинають клітинну мембрану, а багатопрохідні мембранні білки перетинають клітинну мембрану щонайменше двічі (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або більшу кількість разів). Мембранні білки можуть бути визначені як тип I, тип II або тип III в залежності від топології їх кінців і сегмента(ів), що проходять через мембрану, відносно внутрішньої і зовнішньої поверхні клітини. Мембранні білки типу I мають одну трансмембранну область і орієнтовані так, що N-кінець білка знаходиться на позаклітинній стороні подвійного ліпідного шару клітини, а C-кінець білка знаходиться на цитоплазматичній стороні. Мембранні білки типу II також мають одну трансмембранну область, але вони орієнтовані так, що C-кінець білка знаходиться на позаклітинній стороні подвійного ліпідного шару клітини, а N-кінець білка знаходиться на цитоплазматичній стороні. Мембранні білки типу III мають множину трансмембранних сегментів і можуть бути додатково підкласифіковані на основі кількості трансмембранних сегментів і розташування N- і C-залишків.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен CAR, описаний в даному документі, є похідним від однопрохідного мембранного білка типу I. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранні домени, які є похідними від багатопрохідних мембранних білків, також можуть бути придатними для застосування в CAR, описаних в даному документі. Багатопрохідні мембранні білки можуть містити складні (щонайменше 2, 3, 4, 5, 6, 7 чи більше) альфа-спіралі або структуру бета-листа. Переважно, щоб N-кінець і C-кінець багатопрохідного мембранного білка були присутні на протилежних сторонах подвійного ліпідного шару, наприклад, N-кінець білка присутній на цитоплазматичній стороні подвійного ліпідного шару, а C-кінець білка присутній на позаклітинній стороні.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен CAR містить трансмембранний домен, вибраний з групи, що складається з трансмембранного домену

альфа-, бета- або дзета-ланцюга рецептора Т-клітини, CD28, CD3 епсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRFI), CD160, CD19, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI1a, LFA-1, ITGAM, CDI1b, ITGAX, CDI1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY 55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, i/або NKG2C. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен є похідним від молекули, вибраної з групи, що складається з CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен є похідним від CD28. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен є трансмембранним доменом CD28, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 133. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен CD28 кодується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 135.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен є похідним від CD8 α . У деяких варіантах здійснення даного винаходу є трансмембранний домен CD8 α , що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 132. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен CD8 α кодується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 134.

Трансмембранні домени, придатні для застосування в CAR, описаних в даному документі, можуть також містити щонайменше частину сегменту синтетичного білка, що не зустрічається в природі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен є синтетичною альфа-спіраллю або бета-листом, що не зустрічаються в природі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу білковий сегмент становить щонайменше приблизно 20 амінокислот, наприклад, щонайменше 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 або більшу кількість амінокислот. Приклади синтетичних трансмембранних доменів відомі в даній галузі техніки, наприклад, описані в патенті США № 7052906 B1 і публікації PCT Publication № WO 2000/032776 A2, відповідні описи яких включені в цей документ за допомогою посилання.

Трансмембранний домен може містити трансмембранну область і цитоплазматичну область, розташовану на С-кінцевий стороні трансмембранного домену. Цитоплазматична область трансмембранного домену може містити три або більшу кількість амінокислот і, в деяких варіантах здійснення, допомагає орієнтувати трансмембранний домен в подвійному ліпідному шарі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу в трансмембранній області трансмембранного домену присутні один або більша кількість залишків цистеїну. У деяких варіантах здійснення даного винаходу в цитоплазматичній області трансмембранного домену присутні один або більша кількість залишків цистеїну. У деяких варіантах здійснення даного винаходу цитоплазматична область трансмембранного домену містить позитивно заряджені амінокислоти. У деяких варіантах здійснення даного винаходу цитоплазматична область трансмембранного домену містить амінокислоти аргінін, серин і лізин.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранна область трансмембранного домену містить гідрофобні амінокислотні залишки. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен CAR містить штучну гідрофобну послідовність. Наприклад, триплет фенілаланіну, триптофану і валіну може бути присутнім на С-кінці трансмембранного домену. В деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранна область містить в основному гідрофобні амінокислотні залишки, такі як аланін, лейцин, ізолейцин, метіонін, фенілаланін, триптофан або валін. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранна область є гідрофобною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранна область містить полі-лейцин-аланінову послідовність. Гідрофобність, або гідрофобні або гідрофільні властивості білка або білкового сегмента можна оцінити за допомогою будь-якого способу, відомого в даній галузі техніки, наприклад, за допомогою аналізу гідрофобності Kyte і Doolittle.

Внутрішньоклітинний сигнальний домен CAR за даним винаходом містять внутрішньоклітинний сигнальний домен. Внутрішньоклітинний сигнальний домен відповідає за активацію щонайменше однієї з нормальних ефекторних функцій імунної ефекторної клітини, що експресує CAR. Термін "ефекторна функція" відноситься до спеціалізованої функції клітини. Ефекторною функцією Т-клітини, наприклад, може бути цитолітична активність або хелперна активність, включаючи

секрецію цитокінів. Таким чином, термін "цитоплазматична сигнальна область" відноситься до частини білка, яка трансдукує сигнал ефекторної функції і спрямовує клітину для виконання спеціалізованої функції. Незважаючи на те, що зазвичай може застосовуватися весь цитоплазматичний сигнальний домен, у багатьох випадках немає необхідності застосовувати

весь ланцюг. Тією ж мірою, в якій застосовується усічена частина цитоплазматичного сигнального домену, така усічена частина може застосовуватися замість інтактного ланцюга до тих пір, поки вона трансдукує сигнал ефекторної функції. Таким чином, термін "цитоплазматичний сигнальний домен" включає будь-яку усічену частину домену цитоплазматичної сигналізації, достатню для трансдукції сигналу ефекторної функції.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR містить внутрішньоклітинний сигнальний домен, що містить по суті первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини. Термін "первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен" відноситься до цитоплазматичної сигнальної послідовності, яка функціонує стимулюючим чином для індукування імунних ефекторних функцій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен містить сигнальний мотив, відомий як імунорецепторний тирозиновий активуючий мотив, або ITAM. В даному контексті "ITAM" є консервативним білковим мотивом, який зазвичай присутній в хвостовій частині сигнальних молекул, що експресуються у багатьох імунних клітинах. Мотив може містити два повтори амінокислотної послідовності YxxL/I, розділених 6-8 амінокислотами, при цьому кожен x незалежно є будь-якою амінокислотою, яка продукує консервативний мотив YxxL/Ix (6-8) YxxL/I. ITAM в сигнальних молекулах важливі для сигнальної трансдукції всередині клітини, яка опосередковується, щонайменше частково, фосфорилуванням залишків тирозину в ITAM після активації сигнальної молекули. ITAM можуть також функціонувати як ділянки стикування для інших білків, що беруть участь в сигнальних шляхах. Типові ITAM-вмісні первинні цитоплазматичні сигнальні послідовності включають в себе ті, які є похідними від CD3 ζ , FcR-гамма (FCER1G), FcR-бета (Fc Епсилон Rib), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-Епсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b і CD66d.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить цитоплазматичний сигнальний домен CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є цитоплазматичним сигнальним доменом дикого типу CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен дикого типу CD3 ζ містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 140. У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен дикого типу CD3 ζ кодується нуклеїновою кислотою SEQ ID NO: 142. У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є функціональним мутантом цитоплазматичного сигнального домену CD3 ζ , що містить одну або декілька мутацій, таких як Q65K. У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен мутантного CD3 ζ містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 141. У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен мутантного CD3 ζ кодується нуклеїновою кислотою SEQ ID NO: 143.

Спів-стимулюючий сигнальний домен

Багато імунних ефекторних клітин потребують спів-стимуляції, крім стимуляції антигенспецифічного сигналу, для індукування проліферації, диференціювання і виживання клітин, а також для активації ефекторних функцій клітини. Здійснення даного винаходу CAR містить щонайменше один спів-стимулюючий сигнальний домен. В даному контексті термін "спів-стимулюючий сигнальний домен" відноситься щонайменше до частини білка, яка опосередковує трансдукцію сигналу всередині клітини, щоб індукувати імунну відповідь, наприклад, ефекторну функцію. Спів-стимулюючий сигнальний домен химерного рецептора, описаний в даному документі, може бути цитоплазматичним сигнальним доменом зі спів-стимулюючого білка, який трансдукує сигнал і модулює реакції, опосередковані імунними клітинами, такими як Т-клітини, NK-клітини, макрофаги, нейтрофіли або еозинофіли. "Спів-стимулюючий сигнальний домен" може бути цитоплазматичною частиною спів-стимулюючої молекули. Термін "спів-стимулююча молекула" відноситься до родинного зв'язуючого партнера в імунній клітині (такого як Т-клітина), що специфічно зв'язується зі спів-стимулюючим лігандом, тим самим опосередковуючи спів-стимулюючу відповідь імунною клітиною, таку як, але не обмежуючись цим, проліферація і виживання.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен містить один спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить два або більшу кількість (наприклад, 2, 3, 4 або більше) спів-стимулюючих сигнальних доменів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить два або більшу кількість однакових спів-стимулюючих сигнальних доменів, наприклад, дві копії спів-стимулюючого сигнального домену CD28. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить два або більшу кількість спів-стимулюючих сигнальних доменів з різних спів-стимулюючих білків, таких як будь-які два або більша кількість спів-стимулюючих білків, описаних в даному документі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен (такий як цитоплазматичний сигнальний домен CD3 ζ) і один або більшу кількість спів-стимулюючих сигнальних доменів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу один або більша кількість спів-стимулюючих сигнальних доменів і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен (такий як цитоплазматичний сигнальний домен CD3 ζ) є злитими один з одним за допомогою необов'язкових пептидних лінкерів. Первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен і один або більша кількість спів-стимулюючих сигнальних доменів можуть бути розташовані в будь-якому придатному порядку. У деяких варіантах здійснення даного винаходу один або більша кількість спів-стимулюючих сигнальних доменів розташовані між трансмембранним доменом і первинним внутрішньоклітинним сигнальним доменом (таким як домен цитоплазматичної сигналізації CD3 ζ). Безліч спів-стимулюючих сигнальних доменів можуть надавати адитивні або синергічні стимулюючі ефекти.

Активация спів-стимулюючого сигнального домену в клітині-господарі (наприклад, в імунній клітині) може індукувати клітину до підвищення або зниження продукування і секреції цитокінів, фагоцитарні властивості, проліферацію, диференціювання, виживання і/або цитотоксичність. Спів-стимулюючий сигнальний домен будь-якої спів-стимулюючої молекули може бути сумісний для застосування в CAR, описаних в даному документі. Тип(и) спів-стимулюючого сигнального домену вибирають на основі таких факторів, як тип імунних ефекторних клітин, в яких будуть експресуватися ефекторні молекули (наприклад, Т-клітини, NK-клітини, макрофаги, нейтрофіли або еозинофіли), і бажаної імунної ефекторної функції (наприклад, ефект ADCC). Прикладами спів-стимулюючих сигнальних доменів для застосування в CAR можуть бути цитоплазматична сигнальна область спів-стимулюючих білків, включаючи, але не обмежуючись, представників сімейства B7/CD28 (наприклад, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2/B7-DC, і PDCD6); представників суперсімейства TNF (наприклад, 4 1BB/TNFSF9/CD137, 4-1BB ліганд/TNFSF9, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFF R/TNFRSF13C, CD27/TNFRSF7, CD27 ліганд/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, CD30 ліганд/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, CD40/TNFSF5, CD40 ліганд/TNFSF5, DR3/TNFRSF25, GITR/TNFRSF18, GITR ліганд/TNFSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, лімфотоксин-альфа/TNF-бета, OX40/TNFRSF4, OX40 ліганд/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNF-альфа, і TNF RII/TNFRSF1B); представники сімейства SLAM (наприклад, 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6, і SLAM/CD150); і будь-які інші стимулюючі молекули, такі як CD2, CD7, CD53, CD82/Kai-1, CD90/Thy1, CD96, CD160, CD200, CD300a/LMIR1, HLA Class I, HLA-DR, ікарор, інтегрин альфа 4/CD49d, інтегрин альфа 4 бета 1, інтегрин альфа 4 бета 7/LPAM-1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP12, дектин-1/CLEC7A, DPPIV/CD26, EphB6, TIM-1/KIM-1/HAVER, TIM-4, TSLP, TSLP R, лімфоцитарний функціональний антиген-1 (LFA-1), а також NKG2C.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу один або більшу кількість спів-стимулюючих сигнальних доменів вибирають з групи, що складається з CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, CD3, лімфоцитарного функціонального антигену-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 і лігандів, які специфічно зв'язуються з CD83.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен CAR за даним винаходом містить спів-стимулюючий сигнальний домен, похідний від CD28. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить цитоплазматичний сигнальний домен CD3 ζ і спів-стимулюючий сигнальний домен CD28. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен CD28, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 136. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен CD28 кодується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 138. У деяких варіантах здійснення даного

винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен кодується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 228.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен CAR за даним винаходом містить спів-стимулюючий сигнальний домен, похідний від CD137 (тобто, 4-1BB). У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить цитоплазматичний сигнальний домен CD3 ζ і спів-стимулюючий сигнальний домен CD137. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен CD137, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 137. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен CD137 кодується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 139.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен CAR за даним винаходом містить спів-стимулюючий сигнальний домен CD28 і спів-стимулюючий сигнальний домен CD137. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить цитоплазматичний сигнальний домен CD3 ζ , спів-стимулюючий сигнальний домен CD28 і спів-стимулюючий сигнальний домен CD137. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить поліпептид, що містить від N-кінця до C-кінця: спів-стимулюючий сигнальний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен CD137 і цитоплазматичний сигнальний домен CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен CD28, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 136. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен CD28 кодується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 138. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен CD137, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 137. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен CD137 кодується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 139.

Крім того, в межах обсягу даного винаходу пропонуються варіанти будь-якого з спів-стимулюючих сигнальних доменів, описані в даному документі, що забезпечують модулювання спів-стимулюючим сигнальним доменом імунної відповіді імунної клітини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен містить до 10 амінокислотних залишків (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5 або 8) в порівнянні з аналогом дикого типу. Такі спів-стимулюючі сигнальні домени, які містять один або декілька змін амінокислот, можуть згадуватися як варіанти. Мутація амінокислотних залишків спів-стимулюючого сигнального домену може призводити до підвищення трансдукції сигналів і посилення стимуляції імунних відповідей в порівнянні зі спів-стимулюючими сигнальними доменами, які не містять мутації. Мутація амінокислотних залишків спів-стимулюючого сигнального домену може призводити до зниження трансдукції сигналів і ослаблення стимуляції імунних відповідей в порівнянні зі спів-стимулюючими сигнальними доменами, які не містять мутації.

Шарнірна область

CAR за даним винаходом можуть містити шарнірний домен, який розташований між позаклітинним антигензв'язуючим доменом і трансмембранним доменом. Шарнірний домен є сегментом амінокислот, який зазвичай знаходиться між двома доменами білка і може забезпечувати гнучкість білка і переміщення одного або обох доменів один відносно одного. Можна застосовувати будь-яку амінокислотну послідовність, яка забезпечує таку гнучкість і переміщення позаклітинного антигензв'язуючого домену відносно трансмембранного домену ефекторної молекули.

Шарнірний домен може містити приблизно 10-100 амінокислот, наприклад, будь-яку кількість з 15-75 амінокислот, 20-50 амінокислот або 30-60 амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен може мати довжину щонайменше приблизно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 або 75 амінокислот.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен є шарнірним доменом білка, що зустрічається в природі. Шарнірні домени будь-якого білка, відомі в даній галузі техніки, включають шарнірний домен, який є придатним для застосування в описаних в даному документі химерних рецепторах. У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен є щонайменше частиною шарнірного домену білка, зустрічається в природі, і забезпечує гнучкість для химерного рецептора. У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен є похідним від CD8 α . У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен є частиною шарнірного домену CD8 α , наприклад, фрагментом, що містить щонайменше 15 (наприклад, 20, 25, 30, 35 або 40) послідовних амінокислот шарнірного домену CD8 α . У деяких

варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен CD8 α містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 130. У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен CD8 α кодується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 131.

Шарнірні домени антитіл, таких як антитіла IgG, IgA, IgM, IgE або IgD, також є придатними для застосування в рН-залежних химерних рецепторних системах, описаних в даному документі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен шарнірним доменом, який сполучає константні домени CH1 і CH2 антитіла. У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен є доменом антитіла і містить шарнірний домен антитіла і одну або декілька константних областей антитіла. У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен містить шарнірний домен антитіла і константну область CH3 антитіла. У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен містить шарнірний домен антитіла і константні області CH2 і CH3 антитіла. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло є антитілом IgG, IgA, IgM, IgE або IgD. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло є антитілом IgG. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло є антитілом IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірна область містить шарнірну область і константні області CH2 і CH3 антитіла IgG1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірна область містить шарнірну область і константну область CH3 антитіла IgG1.

Пептиди, що не зустрічаються в природі, також можуть застосовуватися як шарнірні домени для химерних рецепторів, описані в даному документі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу шарнірний домен між С-кінцем позаклітинного лігандзв'язуючого домену Fc-рецептора і N-кінцем трансмембранного домену є пептидний лінкер, такий як (GxS) n-лінкер, де x і n незалежно можуть являти собою ціле число від 3 до 12, включаючи 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 і більше.

Сигнальний пептид

CAR за даним винаходом може містити сигнальний пептид (також відомий як сигнальна послідовність) на N-кінці поліпептиду. Як правило, сигнальні пептиди представляють собою послідовності пептидів, які націлюють поліпептид на необхідну ділянку в клітині. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сигнальний пептид націлює ефекторну молекулу на секреторний шлях клітини і забезпечує інтеграцію і закріплення ефекторних молекули в подвійному ліпідному шарі. Сигнальні пептиди, включаючи сигнальні послідовності природних або синтетичних білків, сигнальні послідовності, що не зустрічаються в природі, які придатні для застосування в CAR, описаних в даному документі, будуть знайомі фахівцям в даній галузі техніки. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сигнальний пептид є похідним від молекули, вибраної з групи, що складається з CD8 α , ГМКCF-рецептора α і важкого ланцюга IgG1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сигнальний пептид є похідним від CD8 α . У деяких варіантах здійснення даного винаходу сигнальний пептид CD8 α містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 127. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сигнальний пептид CD8 α кодується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 128 або SEQ ID NO: 129.

IV. Сконструйовані імунні ефекторні клітини.

Додатково в даному винаході пропонуються клітини-господарі (наприклад, імунні ефекторні клітини), що містять будь-який з CAR, описаних в даному документі.

Таким чином, в деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується сконструйована імунна ефекторна клітина (така як Т-клітина), що містить мультиспецифічний (наприклад, біспецифічний) химерний рецептор антигенів (CAR), який містить поліпептид, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше однодоменне антитіло (sdAb), яке специфічно зв'язується з першим антигеном (таким як перший пухлинний антиген), і друге однодоменне антитіло (sdAb), яке специфічно зв'язується з другим антигеном (таким як в другий пухлинний антиген); (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому перший антиген відрізняється від другого антигену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перший антиген і/або другий антиген вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 і гліколіпиду F77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb і/або друге sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу першого однодоменне антитіло і друге однодоменне антитіло є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У

деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу мультиспецифічний CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу мультиспецифічний CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, перший спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є Т-клітиною, НК-клітиною, моноклеарною клітиною периферичної крові (МКПК), гемопоетичною стовбуровою клітиною, плюрипотентною стовбуровою клітиною або ембріональною стовбуровою клітиною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується сконструйована імунна ефекторна клітина (така як Т-клітина), що містить BCMA × CD38 CAR, який містить поліпептид, що включає в себе: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить однодоменне антитіло анти-BCMA і однодоменне антитіло анти-CD38; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb і/або анти-CD38 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA і однодоменне антитіло анти-CD38 є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb є злитим з анти-CD38 sdAb на N-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb є злитим з анти-CD38 sdAb на С-кінці. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 144-151. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA × CD38 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA × CD38 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α),

розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, похідний від CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, похідний від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29. У деяких варіантах реалізації винаходу антитіло анти-CD38 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA × CD38 CAR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 207-216. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є Т-клітиною, NK-клітиною, моноклеарною клітиною периферичної крові (МКПК), гемопоетичною стовбуровою клітиною, плюрипотентною стовбуровою клітиною або ембріональною стовбуровою клітиною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується сконструйована імунна ефекторна клітина (така як Т-клітина), що містить CD19 × CD20 CAR, який містить поліпептид, що включає в себе: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить однодоменне антитіло анти-CD19 і однодоменне антитіло анти-CD20; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb і/або анти-CD20 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 і однодоменне антитіло анти-CD20 є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 є злитим з анти-CD20 sdAb на N-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є злитим з анти-CD20 sdAb на C-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 144-151. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 × CD20 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між C-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 × CD20 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD20 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6. У деякі правила х варіантах здійснення даного винаходу CD19 × CD20 CAR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 206. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є Т-клітиною, NK-клітиною, моноклеарною клітиною периферичної крові (МКПК), гемопоетичною стовбуровою клітиною,

плюрипотентною стовбуровою клітиною або ембріональною стовбуровою клітиною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною.

5 У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується сконструйована імунна ефекторна клітина (така як Т-клітина), що містить CD19×CD22 CAR, який містить поліпептид, що включає в себе: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить однодоменне антитіло анти-CD19 і однодоменне антитіло анти-CD22; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb і/або анти-CD22 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу першого однодоменне антитіло анти-CD22 і друге однодоменне антитіло анти-CD22 є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є злитим з анти-CD22 sdAb на N-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є злитим з анти-CD22 sdAb на C-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 144-151. В деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19×CD22 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між C-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19×CD22 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є Т-клітиною, NK-клітиною, моноклеарною клітиною периферичної крові (МКПК), гемопоетичною стовбуровою клітиною, плюрипотентною стовбуровою клітиною або ембріональною стовбуровою клітиною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується сконструйована імунна ефекторна клітина (така як Т-клітина), що містить CD19×BCMA CAR, який містить поліпептид, що включає в себе: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить однодоменне антитіло анти-CD19 і однодоменне антитіло анти-BCMA; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb і/або анти-BCMA sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA і однодоменне антитіло анти-BCMA є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є злитим з анти-BCMA sdAb на N-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є злитим з анти-BCMA sdAb на C-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 144-151. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що

складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19×BCMA CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19×BCMA CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є Т-клітиною, НК-клітиною, мононуклеарною клітиною периферичної крові (МКПК), гемопоетичною стовбуровою клітиною, плюрипотентною стовбуровою клітиною або ембріональною стовбуровою клітиною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується сконструйована імунна ефекторна клітина (така як Т-клітина), що містить полівалентний химерний рецептор антигенів, який містить поліпептид, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить множину однодоменних антитіл (sdAb), специфічно зв'язуються з антигеном (таким як пухлинний антиген); (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антиген вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 і гліколіпиду F77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу безліч sdAb є верблужим, химерними, людськими або гуманізованими. У деяких варіантах здійснення даного винаходу множина однодоменних антитіл є злитими одне з одним за допомогою пептидних зв'язків або пептидних лінкерів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і

первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR є моноспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR є мультиспецифічним, наприклад, біспецифічним. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 198-201.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується сконструйована імунна ефекторна клітина (така як Т-клітина), що містить полівалентний химерний рецептор антигенів, який містить поліпептид, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше однодоменне антитіло, яке специфічно зв'язується з першим епітопом антигену (такого як пухлинний антиген), і друге однодоменне антитіло, яке специфічно зв'язується з другим епітопом антигену; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому перший епітоп відрізняється від другого епітопу. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антиген вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 і гліколіпіду F77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb і/або друге sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу першого однодоменне антитіло і друге однодоменне антитіло є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є Т-клітиною, NK-клітиною, моноклеарною клітиною периферичної крові (МКПК), гемопоетичною стовбуровою клітиною, плюрипотентною стовбуровою клітиною або ембріональною стовбуровою клітиною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується сконструйована імунна ефекторна клітина (така як Т-клітина), що містить CD19 химерний рецептор антигенів, який містить поліпептид, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD19 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому анти-CD19 sdAb містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30,

CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 248. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є Т-клітиною, NK-клітиною, мононуклеарною клітиною периферичної крові (МКПК), гемопоетичною стовбуровою клітиною, плюрипотентною стовбуровою клітиною або ембріональною стовбуровою клітиною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується сконструйована імунна ефекторна клітина (така як Т-клітина), що містить CD20 CAR, який містить поліпептид, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD20 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому анти-CD20 sdAb містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb додатково містить FR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 244, FR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 245, FR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 246, та/або FR4, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 247. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 249. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є Т-клітиною, NK-клітиною, мононуклеарною клітиною периферичної крові (МКПК), гемопоетичною стовбуровою клітиною, плюрипотентною стовбуровою клітиною або ембріональною стовбуровою клітиною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується сконструйована імунна ефекторна клітина (така як Т-клітина), що містить BCMA CAR, який містить поліпептид, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому анти-BCMA sdAb містить будь-який з наступних елементів:

(12) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;

(13) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30;

5 (14) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31;

(15) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 32;

10 (16) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33;

15 (17) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34;

(18) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35;

20 (19) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36;

(20) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37;

25 (21) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38; або

30 (22) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb містить домен V_HN, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 78-88. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, перший спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 152-162. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є Т-клітиною, НК-клітиною, мононуклеарною клітиною периферичної крові (МКПК), гемопоетичною стовбуровою клітиною, плюрипотентною стовбуровою клітиною або ембріональною стовбуровою клітиною. У деяких варіантах

здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується сконструйована містить поліпептид, що містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD38 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому анти-BCMA sdAb містить будь-який з наступних елементів:

(13) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 64;

(14) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65;

(15) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66;

(16) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 43; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67;

(17) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68;

(18) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 45; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 57; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 69;

(19) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 58; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70;

(20) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 59; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 71;

(21) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 60; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 72;

(22) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 61; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 73;

(23) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 62; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 74; або

(24) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 63; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD38 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD38 sdAb містить домен V_H, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 89-100. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, анти-CD38 sdAb, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, перший

спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується CD38 CAR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 163-174. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є Т-клітиною, NK-клітиною, моноклеарною клітиною периферичної крові (МКПК), гемопоетичною стовбуровою клітиною, плюрипотентною стовбуровою клітиною або ембріональною стовбуровою клітиною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною.

У даному винаході також пропонуються сконструйовані імунні ефекторні клітини, що містять (або експресують) два або більшу кількість різних CAR. Будь-які два або більшу кількість з CAR, описаним в даному документі, можуть експресованого в комбінації. CAR можуть націлюватися на різні антигени, тим самим забезпечуючи синергічні або адитивні ефекти. Оскільки однодоменні антитіла в позаклітинних антигензв'язуючих доменах CAR мають тільки окремі варіабельні ланцюги антигену (наприклад, важкі ланцюги), такі CAR-експресуючі клітини не мають проблем з помилковим спарюванням варіабельних ланцюгів, що продемонстровано в сконструйованих імунних ефекторних клітинах, які спів-експресують два або більшу кількість CAR на основі scFv. Типові сконструйовані імунні ефекторні клітини, які спів-експресують два CAR на основі V_HH, проілюстровані на ФІГ. 1Е. Фахівцєві в даній галузі техніки буде зрозуміло, що CAR на основі інших sdAb або мають інші структури, як описано в даному документі, можуть бути спів-експресовані в сконструйованих імунних ефекторних клітинах. два або більшу кількість CAR можуть бути закодовані на одному і тому ж векторі або на різних векторах.

Сконструйована імунна ефекторна клітина може додатково експресувати один або більшу кількість терапевтичних білків і/або імуномодуляторів, таких як інгібітори імунної контрольної точки. Див., наприклад, міжнародну заявку на патент №№ PCT/CN2016/073489 та PCT/CN2016/087855, які включені в даний документ за допомогою посилання в повному обсязі.

Вектори

В одному аспекті даного винаходу пропонуються вектори для клонування і експресії будь-якого одного з CAR, описаних в даному документі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є придатним для реплікації і інтеграції в клітинах, таких як клітини ссавців. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор є вірусним вектором. Приклади векторів включають в себе, але не обмежуються ними, аденовірусні вектори, аденоасоційовані вірусні вектори, лентівірусний вектор, ретровірусні вектори, вектор вірусу вісповакцини, герпесвірусний вектор і їх похідні. Технологія вірусних векторів добре відома в даній галузі техніки і описана, наприклад, у посібнику Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), і в інших посібниках з вірусології та молекулярної біології.

Розроблено ряд вірусних систем для перенесення генів у клітини ссавців. Наприклад, ретровіруси забезпечують зручну платформу для систем доставки генів. Гетерологічні нуклеїнові кислоти можна вставити у вектор і упакувати в ретровірусні частинки за допомогою методів, відомих в даній галузі техніки. Рекомбінантний вірус потім можна виділити і помістити в сконструйовану клітину ссавця *in vitro* або *ex vivo*. У даній галузі техніки відомий ряд ретровірусних систем. У деяких варіантах здійснення даного винаходу застосовують аденовірусні вектори. У даній галузі техніки відомий ряд аденовірусних векторів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу застосовують лентівірусні вектори. У деяких варіантах здійснення даного винаходу застосовують самоінактивуючі лентівірусні вектори. Наприклад, самоінактивуючі лентівірусні вектори, що несуть послідовність, яка кодує імуномодулятор (наприклад, інгібітор імунної контрольної точки), і/або самоінактивуючі лентівірусні вектори, що несуть химерні рецептори антигенів, можуть бути упаковані згідно з протоколами, відомим в даній галузі техніки. Одержані лентівірусні вектори можна застосовувати для трансдукції клітини ссавців (наприклад, первинних Т-клітин людини) за допомогою способів, відомих в даній галузі техніки. Вектори, одержані з ретровірусів, таких як лентівірус, є придатними інструментами для досягнення тривалого перенесення генів, оскільки вони забезпечують тривалу стабільну інтеграцію трансгену і його поширення в клітинах потомства. Лентівірусні вектори також мають низьку імуногенність і можуть трансдукувати непроліферуючі клітини.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор містить будь-яку з нуклеїнових кислот, що кодують CAR, описаний в даному документі. Нуклеїнові кислоти можна клонувати у вектор за допомогою будь-яких способів молекулярного клонування, відомих в даній галузі техніки, включаючи, наприклад, застосування ділянок рестрикційної ендонуклеази і одного або

5 більшої кількості селектованих маркерів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу нуклеїнова кислота є функціонально зв'язаною з промотором. Різновиди промоторів проаналізовані стосовно експресії генів в клітинах ссавців, і будь-який з промоторів, відомих в даній галузі техніки, можна застосовувати в даному винаході. Промотори можуть бути класифіковані на конститутивні промотори або регульовані промотори, такі як індуковані

10 промотори.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу нуклеїнова кислота, що кодує CAR, є функціонально зв'язаною з конститутивним промотором. Конститутивні промотори дозволяють гетерологічним генам (що також називаються трансгенами) конститутивно експресуватися в клітинах-господарях. Типові конститутивні промотори, що розглядаються в даному документі,

15 включають в себе, але не обмежуються ними, промотори цитомегаловірусу (CMV), фактори елонгації-1 α людини (hEF1 α), промотор убіквітину C (UbiC), промотор фосфогліцерокінази (PGK), ранній промотор вірусу 40 мавп (SV40) і промотор β -актину курей в поєднанні з раннім енхансером CMV (CAGG). Ефективність таких конститутивних промоторів на стимулювання трансгенної експресії детально порівнювалася в множині досліджень. Наприклад, Michael C.

20 Milone et al порівнювали ефективність CMV, hEF1 α , UbiC і PGK з метою стимулювання експресії химерного антигенного рецептора в первинних Т-клітинах людини і прийшли до висновку, що промотор hEF1 α не тільки індукував найвищий рівень експресії трансгену, але також оптимально підтримувався в Т клітинах CD4 і CD8 людини (Molecular Therapy, 17 (8): 1453-1464 (2009)). У деяких варіантах здійснення даного винаходу нуклеїнова кислота, що кодує CAR, є

25 функціонально зв'язаною з промотором hEF1 α .

У деяких варіантах здійснення даного винаходу нуклеїнова кислота, що кодує CAR, є функціонально зв'язаною з індукованим промотором. Індуковані промотори відносяться до категорії регульованих промоторів. Індукований промотор може індукуватись одним або

30 більшою кількістю станів, таких як фізичний стан, мікрооточення сконструйованої імунної ефektorної клітини або фізіологічний стан сконструйованої імунної ефektorної клітини, індуктором (тобто, індукуючим агентом) або їх комбінацією. У деяких варіантах здійснення даного винаходу індукуючий стан не індукє експресію ендогенних генів в сконструйованій клітині ссавців і/або у суб'єкта, який отримує фармацевтичну композицію. У деяких варіантах здійснення даного винаходу індукуючий стан вибирають з групи, що складається з: індуктора,

35 опромінення (наприклад, іонізуюче випромінювання, світло), температури (наприклад, тепло), окислювально-відновних умов, мікрооточення пухлини і стану активації сконструйованої клітини ссавців.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор також містить селектований маркерний ген або репортерний ген для відбору клітин, що експресують CAR, з популяції клітин-господарів, трансфікованих за допомогою лентівірусних векторів. Як селектовані маркери, так і

40 репортерні гени можуть бути фланковані відповідними регуляторними послідовностями з метою забезпечення експресії в клітинах-господарях. Наприклад, вектор може містити транскрипційні і трансляційні термінатори, послідовності ініціації і промотори, придатні для регуляції експресії послідовностей нуклеїнових кислот.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор містить більш ніж одну нуклеїнову кислоту, яка кодує CAR. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор містить нуклеїнову кислоту, яка містить послідовність першої нуклеїнової кислоти, що кодує перший CAR, і послідовність другої нуклеїнової кислоти, що кодує другий CAR, при цьому перша нуклеїнова кислота є функціонально зв'язаною з другою нуклеїновою кислотою за допомогою

50 послідовності третьої нуклеїнової кислоти, яка кодує саморозщеплюваний пептид. У деяких варіантах здійснення даного винаходу саморозщеплюваний пептид вибирають з групи, що складається з T2A, P2A і F2A. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептид T2A має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 254. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептид T2A кодується нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 255. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує BCMA CAR і

55 CD38 CAR, і містить послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 239.

Імунні ефektorні клітини

"Імунні ефektorні клітини" є імунними клітинами, які можуть виконувати імунні ефektorні функції. У деяких варіантах здійснення даного винаходу імунні ефektorні клітини експресують щонайменше Fc γ RIII і виконують ефektorну функцію ADCC. Приклади імунних ефektorних

60

клітин, які опосередковують ADCC, включають в себе моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК), природні клітини-кілери (NK), моноцити, цитотоксичні Т-клітини і нейтрофіли, а також еозинофіли.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу імунні ефektorні клітини є Т-клітинами. У деяких варіантах здійснення даного винаходу Т-клітинами є CD4+/CD8-, CD4-/CD8+, CD4+/CD8+, CD4-/CD8- або їх комбінації. У деяких варіантах здійснення даного винаходу Т-клітини продукують IL-2, TFN, і/або TNF під час експресії CAR і зв'язування з клітинами-мішенями, такими як пухлинні клітини CD20+ або CD19+. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD8+ Т-клітини лізують антигенспецифічні клітини-мішені під час експресії CAR і зв'язування з клітинами-мішенями.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу імунні ефektorні клітини є NK-клітинами. В інших варіантах здійснення даного винаходу імунні ефektorні клітини можуть бути широко відомими лініями клітин, наприклад, клітин NK-92.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу імунні ефektorні клітини є диференційованими від стовбурових клітин, таких як гемопоетична стовбурова клітина, стовбурова клітина, iPS або ембріональна стовбурова клітина.

Сконструйовані імунні ефektorні клітини одержують шляхом введення CAR в імунні ефektorні клітини, такі як Т-клітини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR вводять в імунні ефektorні клітини шляхом трансфекції будь-якої з виділених нуклеїнових кислот або будь-якого з векторів, описаних в розділі III. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CAR вводять в імунні ефektorні клітини шляхом введення білків в клітинну мембрану при проходженні клітин через мікрорідинну систему, таку як CELL SQUEEZE® (див., наприклад, в публікації патентної заявки США № 20140287509).

Способи введення векторів або виділених нуклеїнових кислот в клітини ссавців добре відомі в даній галузі техніки. Описані вектори можна переносити в імунну ефektorну клітину за допомогою фізичних, хімічних або біологічних методів.

Фізичні способи введення вектора в імунну ефektorну клітину включають в себе осадження фосфатом кальцію, ліпофекцію, бомбардування частинками, мікроін'єкцію, електропорацію тощо. Способи продукування клітин, що містять вектори і/або екзогенні нуклеїнові кислоти, добре відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. У деяких варіантах здійснення даного винаходу вектор вводять в клітину за допомогою електропорації.

Біологічні способи введення вектора в імунну ефektorну клітину включають в себе застосування ДНК- та РНК-векторів. Вірусні вектори стали найбільш широко застосовуваною системою для вставки генів в клітини ссавців, наприклад, клітини людини.

Хімічні способи для введення вектора в імунну ефektorну клітину включають в себе колоїдні дисперсійні системи, такі як комплекси макромолекул, нанокapsули, мікросфери, гранули та системи на основі ліпідів, включаючи емульсії масло-в-воді, міцели, змішані міцели, а також ліпосоми. Типова колоїдна система для застосування як несуче середовище для доставки *in vitro* є ліпосомою (наприклад, штучна мембранна везикула).

У деяких варіантах здійснення даного винаходу молекули РНК, що кодують будь-який з CAR, описаних в даному документі, можуть бути одержані за допомогою звичайних способів (наприклад, за допомогою транскрипції *in vitro*), а потім введені в імунні ефektorні клітини за допомогою відомих способів, таких як електропорація мРНК. Див., наприклад, Rabinovich et al., *Human Gene Therapy* 17: 1027-1035.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансдукована або трансфікована імунна ефektorна клітина розмножується *ex vivo* після введення вектора або виділеної нуклеїнової кислоти. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансдукована або трансфікована імунна ефektorна клітина культивується для розмноження щонайменше протягом приблизно 1 дня, 2 днів, 3 днів, 4 днів, 5 днів, 6 днів, 7 днів, 10 днів, 12 днів або 14 днів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансдуковану або трансфіковану імунну ефektorну клітину додатково оцінюють або скринують, щоб вибрати сконструйовану клітину ссавця.

Репортерні гени можна застосовувати для ідентифікації потенційно трансфікованих клітин і для оцінки функціональності регуляторних послідовностей. У більшості випадків, репортерний ген є геном, який не присутній або не експресується організмом-реципієнтом або тканиною, і який кодує поліпептид, експресія якого підтверджується визначеною властивістю, що легко виявляється, наприклад, ферментною активністю. Експресію репортерного гена аналізують у відповідний час після введення ДНК в клітини-реципієнти. Придатні репортерні гени можуть включати в себе гени, що кодують люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфеніколацетилтрансферазу, секретовану лужну фосфатазу або ген зеленого

флуоресцентного білка (наприклад, Ui-Tei et al. FEBS Letters 479: 79-82 (2000)). Придатні системи експресії є добре відомими і можуть бути приготовані за допомогою відомих способів або одержані на комерційних умовах.

Інші способи підтвердження наявності нуклеїнової кислоти, що кодує CAR в сконструйованій імунній ефекторній клітині, включають в себе, наприклад, молекулярно-біологічні аналізи, добре відомі фахівцям в даній галузі техніки, такі як саузерн- і нозерн-блот, ОТ-ПЛР і ПЛР; біохімічні аналізи, такі як виявлення наявності або відсутності конкретного пептиду, наприклад, за допомогою імунологічних методів (таких як ELISA і вестерн-блот).

1. Джерела Т-клітин

До розмноження і генетичної модифікації Т-клітин джерело Т-клітин одержують від індивідуума. Т-клітини можуть бути одержані з різних джерел, включаючи моноклеарні клітини периферичної крові, кістковий мозок, тканину лімфатичних вузлів, пуповинну кров, тканину тимусу, тканину з ділянки інфекції, асцитичну рідину, плевральний випіт, тканину селезінки, а також пухлини. У деяких варіантах здійснення даного винаходу можна застосовувати будь-яку кількість ліній Т-клітин, доступних в даній галузі техніки. У деяких варіантах здійснення даного винаходу Т-клітини можна одержати зі зразка крові, зібраної у суб'єкта, за допомогою будь-якої кількості методів, відомих фахівцям в даній галузі техніки, таких як поділ Ficoll™. У деяких варіантах здійснення даного винаходу клітини з циркулюючої крові індивідуума одержують шляхом аферезу. Як правило, продукт аферезу зазвичай містить лімфоцити, включаючи Т-клітини, моноцити, гранулоцити, В-клітини, інші ядерні лейкоцити, еритроцити і тромбоцити. У деяких варіантах здійснення даного винаходу клітини, одержані з допомогою аферезу, можна промити для видалення фракції плазми і помістити клітини у відповідний буфер або середовище для проведення подальших етапів обробки. У деяких варіантах здійснення даного винаходу клітини промивають фізіологічним розчином, який забуферений фосфатом (PBS). У деяких варіантах здійснення даного винаходу в промивальному розчині відсутній кальцій і може бути відсутнім магній або можуть бути відсутні багато, якщо не всі, двовалентні катіони. Крім того, несподівано було виявлено, що на початкових етапах активації під час відсутності кальцію спостерігається посиленна активація. Фахівцям в даній галузі техніки буде чітко зрозуміло, що етап промивання можна виконати за допомогою способів, відомих фахівцям в даній галузі техніки, таких як застосування напівавтоматичної "проточної" центрифуги (наприклад, пристрій для обробки клітин Cobe 2991, Baxter CytoMate або Haemonetics Cell Saver 5) згідно з інструкціями виробника. Після промивання клітини можна ресуспендувати в різних біосумісних буферах, таких як, наприклад, PBS, який не містить Ca^{2+} , Mg^{2+} -PlasmaLyte A або інший сольовий розчин з буфером або без нього. В альтернативному варіанті небажані компоненти зразка аферезу можна видалити, а клітини безпосередньо ресуспендувати в культуральному середовищі.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу Т-клітини виділяють з лімфоцитів периферичної крові шляхом лізису еритроцитів і виснаження моноцитів, наприклад, за допомогою центрифугування за допомогою градієнта PERCOLL™ або протипотокового елютріаційного центрифугування. Крім того, специфічну субпопуляцію Т-клітин, таку як CD3^{+} , CD28^{+} , CD4^{+} , CD8^{+} , CD45RA^{+} і CD45RO^{+} Т-клітини, можна виділити за допомогою сортування шляхом позитивного або негативного відбору. Наприклад, в деяких варіантах здійснення даного винаходу Т-клітини виділяють шляхом інкубації з анти-CD3/анти-CD28 (тобто 3×28) - кон'югованих гранул, таких як DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 Т, протягом періоду часу, достатнього для позитивного відбору необхідних Т-клітин. У деяких варіантах здійснення даного винаходу період часу становить приблизно 30 хвилин. У подальшому варіанті здійснення даного винаходу період часу становить від 30 хвилин до 36 годин або довше і включає всі цілі значення між ними. У подальшому варіанті здійснення даного винаходу період часу становить щонайменше 1, 2, 3, 4, 5 або 6 годин. У деяких варіантах здійснення даного винаходу період часу становить від 10 до 24 годин. У деяких варіантах здійснення даного винаходу період інкубації становить 24 години. При виділенні Т-клітин у пацієнтів з лейкозом застосування більш тривалих періодів інкубації, наприклад, 24 години, може збільшити кількість одержуваних клітин. Довший час інкубації можна застосовувати для виділення Т-клітин в тому випадку, коли є невелика кількість Т-клітин в порівнянні з іншими типами клітин, наприклад, при виділенні лімфоцитів, які інфільтрують пухлину (TIL), з пухлинної тканини або у індивідуумів з ослабленим імунітетом. Крім того, застосування більш тривалих періодів інкубації може підвищити ефективність захоплення CD8^{+} Т-клітин. Таким чином, шляхом простого скорочення або подовження періоду часу, протягом якого Т-клітини можуть зв'язуватися з гранулами CD3/CD28 , і/або шляхом збільшення або зменшення співвідношення гранул до Т-клітин (як зазначено в даному документі), субпопуляції Т-клітин можуть бути переважно вибрані під час або впритул за

часом до закладки культури або в інші моменти часу під час процесу. Крім того, шляхом збільшення або зменшення співвідношення антитіл анти-CD3 і/або анти-CD28 на гранулах або іншій поверхні, субпопуляції Т-клітин можуть бути переважно вибрані під час або впритул за часом до закладки культури або в інших бажаних моментах часу. Фахівцю в даній галузі техніки

5 буде зрозуміло, що можна застосовувати декілька циклів відбору. У деяких варіантах здійснення даного винаходу може бути бажаним виконати процедуру відбору і застосувати "невідібрані" клітини в процесі активації і розмноження. "Невідібрані" клітини також можуть бути піддані подальшим циклам відбору.

Збагачення популяції Т-клітин шляхом негативного відбору можна виконати за допомогою комбінації антитіл, спрямованих на поверхневі маркери, унікальні для негативно відібраних клітин. Один із способів є сортування та/або відбір клітин за допомогою негативно магнітної імуноадгезії або проточної цитометрії, в якій застосовується суміш з моноклональних антитіл, спрямованих на маркери клітинної поверхні, які присутні на клітинах, вибраних негативно. Наприклад, щоб збагатити CD4+ клітини шляхом негативного відбору, суміш моноклональних

10 антитіл, як правило, включає в себе антитіла до CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR і CD8. У деяких варіантах здійснення даного винаходу може бути бажаним збагачувати або позитивно відбирати регуляторні Т-клітини, які зазвичай експресують CD4+, CD25 +, CD62Lhi, GITR + і FoxP3+. Альтернативно, в деяких варіантах здійснення даного винаходу Т-регуляторні клітини виснажують за допомогою анти-С25-кон'югованих гранул або інших подібних методів відбору.

Для виділення бажаної популяції клітин шляхом позитивного або негативного відбору концентрація клітин і поверхня (наприклад, частинки, такі як гранули) можуть бути змінені. У деяких варіантах здійснення даного винаходу може бути бажаним значне зменшення об'єму, в якому гранули і клітини змішуються разом (тобто збільшення концентрації клітин), з метою забезпечення максимального контакту клітин і гранул. Наприклад, в одному варіанті здійснення даного винаходу застосовують концентрацію 2 мільярди клітин/мл. В одному варіанті здійснення даного винаходу застосовують концентрацію 1 мільярд клітин/мл. У подальшому варіанті здійснення даного винаходу застосовують концентрацію понад 100 мільйонів клітин/мл. У подальшому варіанті здійснення даного винаходу застосовують концентрацію клітин 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 або 50 мільйонів клітин/мл. У ще одному варіанті здійснення даного

20 винаходу застосовують концентрацію клітин 75, 80, 85, 90, 95 або 100 мільйонів клітин/мл. У додаткових варіантах здійснення даного винаходу можна застосовувати концентрацію, що становить 125 або 150 мільйонів клітин/мл. Застосування високих концентрацій може призвести до збільшення кількості одержаних клітин, активації і розмноження клітин. Крім того, застосування високих концентрацій клітин дозволяє більш ефективно захоплювати клітини, які можуть слабо експресувати антигени-мішені, що представляють інтерес, такі як CD28-негативні Т-клітини, або клітини зі зразків, в яких є багато пухлинних клітин (тобто лейкозна кров, пухлинна тканина і т.д.). Такі популяції клітин можуть мати терапевтичну цінність і є бажаними для одержання. Наприклад, застосування високої концентрації клітин дозволяє більш ефективно відбирати CD8+ Т-клітини, які зазвичай характеризуються нижчим рівнем експресії

30 CD28.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу може бути бажаним застосування більш низьких концентрацій клітин. Шляхом суттєвого розведення суміші Т-клітин і поверхні (наприклад, частинок, таких як гранули), взаємодії між частинками і клітинами мінімізуються. Цей спосіб вибирають для клітин, які експресують велику кількість бажаних антигенів, пов'язаних з частинками. Наприклад, CD4+ Т-клітини експресують більш високі рівні CD28 і більш ефективно захоплюються, ніж CD8+ Т-клітини в розбавлених концентраціях. У деяких варіантах здійснення даного винаходу застосовувана концентрація клітин становить 5×10^6 /мл. У деяких варіантах здійснення даного винаходу застосовувана концентрація клітин може становити від 1×10^5 /мл до 1×10^6 /мл, а також будь-яке ціле значення між ними.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу клітини можна інкубувати на ротаторі протягом різних проміжків часу зі змінними швидкостями при 2-10 °C або при кімнатній температурі.

Т-клітини для стимуляції також можна заморозити після етапу промивання. Не бажаючи бути обмеженими будь-якою теорією, вважають, що заморожування і наступний етап відтавання

55 забезпечують більш однорідний продукт шляхом видалення гранулоцитів і в деякій мірі моноцитів в популяції клітин. Після етапу промивання, в результаті якого видаляється плазма і тромбоцити, клітини можна суспендувати в замороженому розчині. Незважаючи на те, що багато розчинів і параметрів заморожування відомі в даній галузі техніки і будуть придатні в цьому контексті, один із способів включає в себе застосування PBS, що містить 20 % ДМСО та 8 % сироваткового альбуміну людини, або культуральне середовище, що містить 10 %

60

декстрану 40 і 5 % глюкози, 20 % сироваткового альбуміну людини і 7,5 % ДМСО, або 31,25 % плазмаліту-А (Plasmalyte-A), 31,25 % глюкози 5 %, 0,45 % NaCl, 10 % декстрану 40 і 5 % глюкози, 20 % сироваткового альбуміну людини і 7,5 % ДМСО або інших придатних середовищ для заморожування клітин, що містять, наприклад, Геспан (Hespan) і Плазмаліт А (PlasmaLyte А), після обробки якими клітини заморожують до -80 °С з інтенсивністю 1° на хвилину і зберігають в паровій фазі резервуара для зберігання рідкого азоту. Можна застосовувати й інші методи контрольованого заморожування, а також неконтрольоване миттєве заморожування при t-20 °С або в рідкому азоті.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу кріоконсервовані клітини розморожують і промивають, як описано в даному документі, і залишають на одну годину при кімнатній температурі перед активацією.

У даному винаході також розглядається збір зразків крові або продукту аферезу у суб'єкта в період часу до того, коли можуть знадобитися розмножені клітини, як описано в даному документі. Таким чином, клітини, що підлягають розмноженню, можна зібрати з їх джерела одержання в будь-який необхідний момент часу, при цьому бажані клітини, такі як Т-клітини будуть виділятися і заморожуватися для подальшого застосування з метою Т-клітинної терапії ряду захворювань або патологічних станів, при яких буде ефективна Т-клітинна терапія, така як описана в даному документі. В одному варіанті здійснення даного винаходу зразок крові або аферезу отримують від в цілому здорового суб'єкта. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зразок крові або аферезу одержують від в цілому здорового суб'єкта, який схильний до ризику розвитку захворювання, але у якого захворювання ще не розвинулося, при цьому клітини, що представляють інтерес, виділяють і заморожують для подальшого застосування. У деяких варіантах здійснення даного винаходу Т-клітини можна розмножити, заморозити і застосовувати пізніше. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зразки збирають у пацієнта незабаром після встановлення діагнозу конкретного захворювання, як описано в даному документі, але до застосування будь-якого виду лікування. У подальшому варіанті здійснення даного винаходу клітини виділяють з зразка крові або аферезу у суб'єкта до застосування будь-якої кількості відповідних способів лікування, включаючи, але не обмежуючись ними, лікування такими агентами, як наталізумаб, ефалізумаб, протівірусні агенти, хіміотерапію, радіаційне опромінення, імуносупресивні агенти, такі як циклоспорин, азатіоприн, метотрексат, мікофенолат і FK506, антитіла або інші імуноаблативні агенти, такі як CAMPATH, антитіла анти-CD3, цитоксан, флударабін, циклоспорин, FK506, рапаміцин, мікофенольна кислота, стероїди, FR901228, а також променева обробка. Ці препарати інгібують кальциневрін кальційзалежну фосфатазу (циклоспорин і FK506) або інгібують кіназу p70S6, що важливо для передачі сигналів, індукованих фактором росту (рапаміцин) (Liu et al., Cell 66: 807-815, 1991; Henderson et al., Immun 73: 316-321, 1991; Biero et al., Curr. Opin. Immun. 5: 763-773, 1993). У подальшому варіанті здійснення даного винаходу клітини виділяють від пацієнта і заморожують для подальшого застосування в поєднанні з (наприклад, до, одночасно або після) трансплантацією кісткового мозку або стовбурових клітин, Т-клітинною абляційною терапією із застосуванням або хіміотерапевтичних агентів, таких як флударабін, зовнішньої дистанційної променевої терапії (ХРТ), циклофосфаміду, або антитіл, таких як ОКТ3 або CAMPATH. В іншому варіанті здійснення даного винаходу клітини можуть бути попередньо виділені і заморожені для подальшого застосування з метою лікування після В-клітинної абляційної терапії із застосуванням таких агентів, які реагують з CD20, наприклад, рітуксан.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу Т-клітини отримують від пацієнта безпосередньо після лікування. В цьому відношенні було виявлено, що після деяких видів лікування раку, зокрема, лікування препаратами, які вражають імунну систему, незабаром після лікування в ході періоду, коли пацієнт зазвичай відновлюється після лікування, якість одержаних Т-клітин може бути оптимальною або поліпшеною стосовно їх здатності розмножуватися ex vivo. Аналогічним чином, після здійснення процесів ex vivo із застосуванням способів, описаних в даному документі, ці клітини можуть бути в кращому стані, що забезпечує поліпшене щеплення і розмноження in vivo. Таким чином, в контексті даного винаходу передбачається збирати клітини крові, включаючи Т-клітини, дендритні клітини або інші клітини гематопоетичної лінії, під час цієї фази відновлення. Крім того, в деяких варіантах здійснення даного винаходу мобілізацію (наприклад, мобілізацію з ГМКСФ) і схеми підготовки до лікування можна застосовувати для створення стану у суб'єкта, при якому перевага віддається репопуляції, рециркуляції, регенерації та/або розмноженню конкретних типів клітин, особливо протягом певного періоду часу після терапії. Ілюстративні типи клітин включають Т-клітини, В-клітини, дендритні клітини та інші клітини імунної системи.

2. Активація і розмноження Т-клітин

Т-клітини можна активувати і розмножити незалежно від того, проводити це до чи після їх генетичної модифікації із застосуванням CAR, описаних в даному документі, здійснюючи зазначену активацію і розмноження, як правило, за допомогою способів, описаних, наприклад, в патенті США №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041; та в публікації патентної заявки США № 20060121005.

Як правило, Т-клітини можна розмножити шляхом контакту з поверхнею з прикріпленим до неї агентом, який стимулює сигнал, асоційований з комплексом CD3/TCR, і лігандом, який стимулює спів-стимулюючу молекулу на поверхні Т-клітин. Зокрема, популяції Т-клітин можуть стимулюватися, як описано в даному документі, наприклад, шляхом приведення в контакт з антитілом анти-CD3 або його антигензв'язуючим фрагментом, або антитілом анти-CD2, іммобілізованим на поверхні, або шляхом приведення в контакт з активатором протеїнкінази С (наприклад, бріостатином) в поєднанні з іонофором кальцію. Для спів-стимуляції додаткової молекули на поверхні Т-клітин застосовується ліганд, який зв'язує додаткову молекулу. Наприклад, популяцію Т-клітин можна приводити в контакт з антитілом анти-CD3 і антитілом анти-CD28 в умовах, придатних для стимуляції проліферації Т-клітин. Для стимуляції проліферації або CD4⁺ Т-клітин, або CD8⁺ Т-клітин, антитіла анти-CD3 і антитіла анти-CD28. Можна застосовувати антитіла анти-CD28, приклади яких включають в себе 9,3, В-Т3, XR-CD28 (Diacione, Безансон, Франція), як і інші відомі в даній галузі техніки способи (Berg et al., Transplant Proc. 30 (8): 3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190 (9): 1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227 (1-2): 53-63, 1999).

У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний стимулюючий сигнал і спів-стимулюючий сигнал для Т-клітини можна одержати за допомогою різних протоколів. Наприклад, агенти, що забезпечують кожен сигнал, можуть перебувати в розчині або бути з'єднані з поверхнею. При з'єднанні з поверхнею агенти можуть бути з'єднані з однією і тією ж поверхнею (тобто у формі "цис") або з роздільними поверхнями (тобто у формі "транс"). В альтернативному варіанті один агент може бути пов'язаний з поверхнею і з іншим агентом в розчині. В одному варіанті здійснення даного винаходу агент, що забезпечує спів-стимулюючий сигнал, пов'язаний з поверхнею клітини, а агент, що забезпечує первинний активуючий сигнал, знаходиться в розчині або з'єднаний з поверхнею. У деяких варіантах здійснення даного винаходу обидва агенти можуть перебувати в розчині. В іншому варіанті здійснення даного винаходу агенти можуть знаходитися в розчинній формі, а потім поперечно зшиті з поверхнею, такою як клітина, експресують Fc-рецептори, або антитіло або інший зв'язуючий агент, який буде зв'язуватися з агентами. У зв'язку з цим, див., наприклад, публікації патентних заявок США №№ 20040101519 і 20060034810 для штучних антигенпредставляючих клітин (aAPC), які призначені для застосування з метою активації і розмноження Т-клітин в даному винаході.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу Т-клітини комбінують з гранулами, покритими агентом, потім гранули і клітини поділяють, після чого клітини культивують. В альтернативному варіанті здійснення даного винаходу, перед культивуванням, клітини і гранули, покриті агентом, не поділяють, а культивують разом. У подальшому варіанті здійснення даного винаходу гранули і клітини спочатку концентрують шляхом застосування сили, такої як магнітна сила, що призводить до посиленого лігування маркерів клітинної поверхні, тим самим індукуючі клітинну стимуляцію.

Як приклад білки клітинної поверхні можна лігувати, забезпечивши контакт парамагнітних гранул, до яких прикріплені анти-CD3 і анти-CD28 (3×28 гранул), з Т-клітинами. В одному варіанті здійснення даного винаходу клітини (наприклад, від 104 до 109 Т-клітин) і гранули (наприклад, парамагнітні гранули DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 Т в співвідношенні 1:1) комбінують в буфер, переважно PBS (без двовалентних катіонів, таких як кальцій і магній). Як і в попередньому випадку, фахівці в даній галузі техніки можуть легко оцінити, яку концентрацію клітин можна застосовувати. Наприклад, клітини-мішені можуть дуже рідко зустрічатися в зразку і складати тільки 0,01 % зразка, або весь зразок (тобто 100 %) може складатися з клітин-мішеней, що представляють інтерес. Відповідно, для даного винаходу можна застосовувати будь-яку кількість клітин. У деяких варіантах здійснення даного винаходу може бути бажаним значне зменшення об'єму, в якому частинки і клітини змішуються разом (тобто збільшення концентрації клітин), з метою забезпечення максимального контакту клітин і частинок. Наприклад, в одному варіанті здійснення даного винаходу застосовують концентрацію приблизно 2 мільярдів клітин/мл. В іншому варіанті здійснення даного винаходу застосовують концентрацію понад 100 мільйонів клітин/мл. У додатковому варіанті здійснення даного винаходу застосовують концентрацію клітин 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 або 50 мільйонів клітин/мл. У ще одному варіанті здійснення даного винаходу застосовують концентрацію клітин

75, 80, 85, 90, 95 або 100 мільйонів клітин/мл. У додаткових варіантах здійснення даного винаходу можна застосовувати концентрацію, що становить 125 або 150 мільйонів клітин/мл. Застосування високих концентрацій може призвести до збільшення кількості одержаних клітин, активації і розмноження клітин. Крім того, застосування високих концентрацій клітин дозволяє

5 більш ефективно захоплювати клітини, які можуть слабо експресувати антигени-мішені, що представляють інтерес, такі як CD28-негативні Т-клітини. Такі популяції клітин можуть мати терапевтичну цінність і є бажаними для одержання в деяких варіантах здійснення даного винаходу. Наприклад, застосування високої концентрації клітин дозволяє більш ефективно

10 відбирати CD8⁺ Т-клітини, які зазвичай характеризуються нижчим рівнем експресії CD28. У деяких варіантах здійснення даного винаходу суміш можна культивувати протягом декількох годин (приблизно 3 годин) до приблизно 14 днів або будь-якого цілого значення години між ними. В іншому варіанті здійснення даного винаходу суміш можна культивувати

15 разом протягом приблизно восьми днів. В іншому варіанті здійснення даного винаходу гранули і Т-клітини культивують разом протягом 2-3 днів. Також можуть знадобитися кілька циклів стимуляції, в результаті чого час культивування Т-клітин може становити 60 днів або більше.

Умови, придатні для культивування Т-клітин, включають в себе придатне середовище (наприклад, мінімальне основне середовище або середовище RPMI 1640 або X-vivo 15 (Lonza)),

20 які можуть містити чинники, необхідні для проліферації і життєздатності, включаючи сироватку (наприклад, фетальну бичачу або людську сироватку), інтерлейкін-2 (IL-2), інсулін, IFN- γ , IL-4, IL-7, ГМКСФ, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β і TNF- α або будь-які інші добавки для росту клітин, відомих фахівцям в даній галузі техніки. Інші добавки для росту клітин включають в себе, але не обмежуються ними, поверхнево-активну речовину, плазматат і відновники, такі як N-ацетилцистеїн і 2-меркаптоетанол. Середовище може включати в себе RPMI 1640, AIM-V,

25 DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 і X-Vivo 20, Optimizer, з доданими амінокислотами, пируватом натрію і вітамінами, без сироватки або з додаванням відповідної кількості сироватки (або плазми) або певного набору гормонів і/або кількості цитокіну(ів), достатнього для росту і розмноження Т-клітин. Антибіотики, наприклад, пеніцилін і стрептоміцин, включені тільки в експериментальні культури, а не в культури клітин, які призначені для введення суб'єкту.

30 Клітини-мішені витримують в умовах, необхідних для підтримки росту, наприклад, при відповідній температурі (наприклад, 37 °C) і у відповідній атмосфері (наприклад, повітря плюс 5 % CO₂). Т-клітини, які зазнали впливу стимуляції протягом різних періодів часу, можуть володіти різними характеристиками. Наприклад, типові продукти крові або моноклеарних клітин периферичної крові, одержані в результаті аферезу, мають популяцію хелперних Т-клітин

35 (TH, CD4⁺), яка є більш чисельною, ніж популяція цитотоксичних або супресорних Т-клітин (TC, CD8). Розмноження Т-клітин *ex vivo* в результаті стимуляції рецепторів CD3 і CD28 призводить до продукування популяції Т-клітин, які до приблизно 8-9 днів складаються переважно з TH-клітин, тоді як приблизно через 8-9 днів популяція Т-клітин включає в себе все більш численну популяцію TC-клітин. Відповідно, в залежності від мети лікування, може бути кращим введення

40 суб'єкту популяції Т-клітин, що включає переважно TH-клітини. Аналогічним чином, якщо виділена антигенспецифічна підмножина TC-клітин, може бути корисно розмножити цю підмножину до більшого ступеня.

Крім того, на додаток до маркерів CD4 і CD8, інші фенотипічні маркери суттєво розрізняються, але в значній мірі є відтворюваними під час процесу розмноження клітин. Таким

45 чином, така відтворюваність дає можливість адаптувати активований продукт Т-клітин для конкретних цілей.

V. Фармацевтичні композиції

Також в даному винаході пропонуються фармацевтичні композиції, що містять будь-яке з однокласованих антитіл (такі як анти-CD19, анти-CD20, анти-BCMA або анти-CD38 sdAb) або

50 будь-яку зі сконструйованих імунних ефektorних клітин, що містять будь-який з CAR, як описано в даному документі, і фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтичні композиції можна одержати шляхом змішування однокласованого антитіла або множини сконструйованих імунних ефektorних клітин, що володіють бажаним ступенем чистоти, в деяких випадках, в поєднанні з фармацевтично прийнятними носіями, допоміжними речовинами або стабілізаторами

55 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), у вигляді ліофілізованих препаратів або водних розчинів. Прийнятні носії, допоміжні речовини або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів в застосовуваних дозах і концентраціях і включають в себе буфери, антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту, метіонін, вітамін Е, метабісульфіт натрію; консерванти, ізотонічні

речовини, стабілізатори, комплекси металів (наприклад, Zn-білкові комплекси); хелатуючі агенти, такі як ЕДТА і/або неіонні поверхнево-активні речовини.

Буфери застосовують для контролю рН в діапазоні, який оптимізує терапевтичну ефективність, особливо якщо стабільність залежить від рН. Буфери переважно присутні в концентраціях від приблизно 50 мМ до приблизно 250 мМ. Придатні буферні агенти для застосування за даним винаходом включають в себе як органічні, так і неорганічні кислоти і їх солі. Наприклад, цитрат, фосфат, сукцинат, тартрат, фумарат, глюконат, оксалат, лактат, ацетат. Крім того, буфери можуть містити солі гістидину і триметиламіну, такі як Тріс.

Консерванти додаються для уповільнення росту мікроорганізмів і зазвичай присутні в діапазоні від 0,2 % до 1,0 % (мас./об.). Придатні консерванти для застосування за даним винаходом включають в себе хлорид октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; галогеніди бензалконію (наприклад, хлорид, бромід, йодид), хлорид бензетонію; тімеросал, фенол, бутіл або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил або пропілпарабен; катехін; резорцин; циклогексанол, 3-пентанол і м-крезол.

Регулятори тоничності, що іноді називаються "стабілізаторами", присутні для регулювання або підтримки тоничності рідини в композиції. При застосуванні з великими зарядженими біомолекулами, такими як білки і антитіла, регулятори тоничності часто називають "стабілізаторами", оскільки вони можуть взаємодіяти з зарядженими групами бічних ланцюгів амінокислот, тим самим зменшуючи потенціал міжмолекулярних та внутрішньомолекулярних взаємодій. Регулятори тоничності можуть бути присутніми в будь-якій кількості від 0,1 до 25 мас. %, переважно від 1 до 5 мас. %, з урахуванням відносних кількостей інших інгредієнтів. Переважні регулятори тоничності включають в себе багатоатомні цукрові спирти, переважно тригідратні або вищі цукрові спирти, такі як гліцерин, еритрит, арабітол, ксиліт, сорбіт і маніт.

Додаткові допоміжні речовини включають в себе агенти, які можуть функціонувати як одна або декілька з наступних речовин: (1) об'ємоутворюючі агенти, (2) підсилювачі розчинності, (3) стабілізатори (4) і агенти, що запобігають денатурації або прилипання до стінки контейнера. Такі допоміжні речовини включають в себе: багатоатомні цукрові спирти (перераховані вище); амінокислоти, такі як аланін, гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін, лізин, орнітин, лейцин, 2-фенілаланін, глутамінова кислота, треонін і т.д.; органічні цукри або цукрові спирти, такі як сахароза, лактоза, лактит, трегалоза, стахіоза, маноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, рибітол, міонісітоза, міонізітол, галактоза, галактит, гліцерин, циклітоли (наприклад, інозит), поліетиленгліколь; сірковмісні відновники, такі як сечовина, глутатіон, тіоктова кислота, тіогліколят натрію, тіогліцерин, α -монотіогліцерин і тіосульфат натрію; білки з низькою молекулярною масою, такі як людський сироватковий альбумін, бичачий сироватковий альбумін, желатин або інші імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; моносахариди (наприклад, ксилоза, маноза, фруктоза, глюкоза, дисахариди (наприклад, лактоза, мальтоза, сахароза), трисахариди, такі як рафінози і полісахариди, такі як декстрин або декстран.

Неіонні поверхнево-активні речовини або детергенти (також відомі як "змочуючі агенти") містяться для полегшення солюбілізації терапевтичного агента, а також захисту терапевтичного білка від агрегації, викликаній перемішуванням, що також дозволяє складу піддаватися напрузі поверхні зсуву без ініціювання денатурації активного терапевтичного білка або антитіла. Неіонні поверхнево-активні речовини містяться в діапазоні від приблизно 0,05 мг/мл до приблизно 1,0 мг/мл, переважно від приблизно 0,07 мг/мл до приблизно 0,2 мг/мл.

Придатні неіонні поверхнево-активні речовини включають в себе полісорбати (20, 40, 60, 65, 80 і т.д.), поліоксимери (184, 188 і т.д.), полііоли PLURONIC®, TRITON®, поліоксиетиленові сорбітанові моноефіри (TWEEN®-20, TWEEN®-80 і т.д.), лауромакрогол 400, поліоксил 40 стеарат, поліоксиетилен гідрогенізована касторова олія 10, 50 і 60, моностеарат гліцерину, складний ефір сахарози і жирної кислоти, метилцелюлозу і карбоксиметилцелюлозу. Аніонні детергенти, які можна застосовувати, включають в себе лаурилсульфат натрію, диоктилсульфосукцинат натрію і диоктилсульфонат натрію. Катіонні детергенти включають в себе хлорид бензалконію або хлорид бензетонію.

Фармацевтичні композиції для введення *in vivo* повинні бути стерильними. Стерилізацію фармацевтичної композиції можна здійснити шляхом фільтрації через стерильні фільтруючі мембрани. Як правило, фармацевтичні композиції за даним винаходом, поміщають в контейнер зі стерильним входним отвором, наприклад, пакет або флакон для внутрішньовенного розчину з пробкою, проколюють голкою для підшкірної ін'єкції.

Шлях введення відповідає відомим і прийнятим способам, наприклад, одноразове або множинне введення болюсної дози або інфузія протягом тривалого періоду часу відповідним шляхом, наприклад, ін'єкція або інфузія за допомогою підшкірного, внутрішньовенного,

внутрішньочеревного, внутрішньом'язового, внутрішньо-артеріального, внутрішньоосередкового або внутрішньосуглобового шляху, місцеве введення, інгаляція або введення з уповільненим вивільненням або пролонгованим вивільненням.

Можна виготовити препарати з уповільненим вивільненням. Відповідні приклади препаратів уповільненого вивільнення включають в себе напівпроникні матриці твердих гідрофобних полімерів, що містять антагоніст і присутні у вигляді формованих виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул. Приклади матриць з уповільненим вивільненням включають в себе поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксиетилметакрилату) або полі(вініловий спирт)), полілактид (патенті США № 3773919), співполімери L-глутамінової кислоти і γ -етил-L-глутамату, нерозкладаний етилвінілацетат, розкладані співполімери молочної кислоти-гліколевої кислоти, такі як LUPRON DEPOT™ (ін'єкційні мікросфери, що складаються зі співполімеру молочної кислоти-гліколевої кислоти і лейпроліду ацетату), і полі-D-(-)-3-гідроксимасляну кислоту.

Фармацевтичні композиції, описані в даному документі, також можуть містити більше однієї активної сполуки або агента, необхідного для конкретного показання, що підлягає лікуванню, переважно з додатковими видами активності, які не чинять негативного впливу один на одного. В альтернативному або додатковому варіанті композиція може містити цитотоксичний агент, хіміотерапевтичний агент, цитокін, імунодепресанти або агент, що інгібує ріст. Такі молекули можуть бути присутніми в комбінації в кількостях, які ефективні при застосуванні з передбачуваною метою.

Активні інгредієнти можна включити в мікрокапсули, одержані, наприклад, за допомогою методик коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад, гідроксиметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули і полі-(метилметакрилатні) мікрокапсули, відповідно, в колоїдні системи доставки лікарських засобів (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методики описані в Remington's Pharmaceutical Sciences 18th edition.

VI. Способи лікування раку

Цей винахід відноситься до способів і композицій для застосування в клітинній імунотерапії. У деяких варіантах здійснення даного винаходу клітинна імунотерапія призначена для лікування раку, включаючи, але не обмежуючись цим, гематологічні злоякісні пухлини і солідні пухлини. Будь-які однодоменні антитіла, химерні рецептори антигенів і сконструйовані імунні ефекторні клітини, описані в даному документі, можна застосовувати в способі лікування раку. Описані в даному документі CAR можуть бути придатні для лікування пухлин, що характеризуються мутаціями, які зумовлюють продукування зниклих варіантів антигену, а також для зниження резистентності до існуючих способів лікування. У деяких варіантах здійснення даного винаходу способи і композиції, описані в даному документі, можна застосовувати для лікування інших захворювань, які асоційовані з антигенами, що специфічно розпізнаються однодоменними антитілами або CAR, включаючи, наприклад, аутоімунні захворювання.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування раку у індивідуума (наприклад, у людини-індивідуума), що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції, що містить: (1) сконструйовану імунну ефекторну клітину (таку як Т-клітина), що містить мультиспецифічний (наприклад, біспецифічний) химерний рецептор антигенів (CAR), який містить поліпептид, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше однодоменне антитіло (sdAb), яке специфічно зв'язується з першим антигеном (таким як перший пухлинний антиген), і друге однодоменне антитіло (sdAb), яке специфічно зв'язується з другим антигеном (таким як другий пухлинний антиген); (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому перший антиген відрізняється від другого антигену; і (2) фармацевтично прийнятний носій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перший антиген і/або другий антиген вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 і гліколіпіду F77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb і/або друге sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше однодоменне антитіло і друге однодоменне антитіло є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний

сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу мультиспецифічний CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу мультиспецифічний CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD28, перший спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є гемобластозом, таким як множинна мієлома, гострий лімфобластний лейкоз або хронічний лімфоцитарний лейкоз. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є солідним раком.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування раку у індивідуума (наприклад, у людини-індивідуума), що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції, що містить: (1) сконструйовану імунну ефекторну клітину (таку як Т-клітину), яка містить BCMA $\times$ CD38 CAR, який містить поліпептид, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить одностороннє антитіло анти-BCMA і одностороннє антитіло анти-CD38; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен; а також (2) фармацевтично прийнятний носій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb і/або анти-CD38 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу одностороннє антитіло анти-BCMA і одностороннє антитіло анти-CD38 є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb є злитим з анти-CD38 sdAb на N-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb є злитим з анти-CD38 sdAb на С-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 144-151. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA $\times$ CD38 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA $\times$ CD38 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид

CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, похідний від CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, похідний від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-BCMA містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29. У деяких варіантах реалізації винаходи антитіло анти-CD38 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA $\times$ CD38 CAR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 207-216. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є гемобластозом. У деяких варіантах здійснення даного винаходу гемобластоз є множинною мієломою.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування раку у індивідуума (наприклад, у людини-індивідуума), що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції, що містить: (1) а CD19 $\times$ CD20 CAR, який містить поліпептид, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить однодоменне антитіло анти-CD19 і однодоменне антитіло анти-CD20; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен; і (2) фармацевтично прийнятний носій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb і/або анти-CD20 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD20 і однодоменне антитіло анти-CD20 є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 є злитим з анти-CD20 sdAb на N-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є злитим з анти-CD20 sdAb на C-кінці. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 144-151. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 $\times$ CD20 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між C-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 $\times$ CD20 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD28, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу однодоменне антитіло анти-CD19 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антитіло анти-CD20 містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6. У деякі правила х варіантах здійснення даного винаходу CD19 $\times$ CD20 CAR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 206. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є

гемобластозом. У деяких варіантах здійснення даного винаходу гемобластозу є В-клітинною лімфомою.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування раку у індивідуума (наприклад, у людини-індивідуума), що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції, що містить: (1) сконструйовану імунну ефекторну клітину (таку як Т-клітина), що містить полівалентний химерний рецептор антигенів, який містить поліпептид, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить множину однодомених антитіл (sdAb), які специфічно зв'язуються з антигеном (таким як пухлинний антиген); (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен; а також (2) фармацевтично прийнятний носій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антиген вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 і гліколіпіду F77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу множина sdAb є верблужими, химерними, людськими або гуманізованими. У деяких варіантах здійснення даного винаходу множина однодомених антитіл є злитими одне з одним за допомогою пептидних зв'язків або пептидних лінкерів. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або 5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 198-201 і 265-270. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є гемобластозом, таким як множинна мієлома, гострий лімфобластний лейкоз або хронічний лімфоцитарний лейкоз. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є солідним раком.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування раку у індивідуума (наприклад, у людини-індивідуума), що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції, що містить: (1) сконструйовану імунну ефекторну клітину (таку як Т-клітина), що містить полівалентний химерний рецептор антигенів, який містить поліпептид, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить перше однодоменне антитіло, яке специфічно зв'язується з першим епітопом антигену (таким як пухлинний антиген), і друге однодоменне антитіло, яке специфічно зв'язується з другим епітопом антигену; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому перший епітоп відрізняється від другого епітопу; а також (2) фармацевтично прийнятний носій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антиген вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 і гліколіпіду F77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше sdAb і/або друге sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу перше однодоменне антитіло і друге однодоменне антитіло є злитими одне з одним за допомогою пептидного зв'язку або пептидного лінкера. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 (наприклад, не більше ніж приблизно 35, 25, 20, 15, 10 або

5) амінокислот. У деяких варіантах здійснення даного винаходу трансмембранний домен вибирають з групи, що складається з CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефektorної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу полівалентний CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD8 α , спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, отриманий з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефektorна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефektorна клітина є аллогенною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є гемобластозом, таким як множинна мієлома, гострий лімфобластний лейкоз або хронічний лімфоцитарний лейкоз. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є солідним раком.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування раку у індивідуума (наприклад, у людини-індивідуума), що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції, що містить: (1) сконструйовану імунну ефektorну клітину (таку як Т-клітина), що містить CD19 химерний рецептор антигенів, який містить поліпептид, що містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD19 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому анти-CD19 sdAb містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; і (2) фармацевтично прийнятний носій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефektorної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8 α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8 α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8 α , позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8 α , трансмембранний домен CD28, перший спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3 ζ . У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD19 CAR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 248. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефektorна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефektorна клітина є аллогенною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є гемобластозом, таким як множинна мієлома, гострий лімфобластний лейкоз або хронічний лімфоцитарний лейкоз. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є солідним раком.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування раку у індивідуума (наприклад, у людини-індивідуума), що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції, що містить: (1) сконструйовану імунну ефektorну клітину

(таку як Т-клітина), що містить CD20 CAR, що містить поліпептид, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD20 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, при цьому анти-CD20 sdAb містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6; і (2) фармацевтично прийнятний носій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb додатково містить FR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 244, FR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 245, FR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 246, та/або FR4, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 247. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD20 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, перший спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 249. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD20 CAR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 249. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є гемобластозом, таким як множинна мієлома, гострий лімфобластний лейкоз або хронічний лімфоцитарний лейкоз. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є солідним раком.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування раку у індивідуума (наприклад, у людини-індивідуума), що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції, що містить: (1) сконструйовану імунну ефекторну клітину (таку як Т-клітина), що містить CD20 CAR, який містить поліпептид, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-BCMA sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, і (2) фармацевтично прийнятний носій, при цьому анти-BCMA sdAb містить будь-який з наступних елементів:

(23) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;

(24) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30;

(25) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31;

(26) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 32;

(27) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33;

(28) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34;

5 (29) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35;

(30) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36;

10 (31) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37;

(32) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38; або

(33) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39.

20 У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 78-88. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу
25 первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR
30 додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, перший спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний
40 внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу BCMA CAR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що
45 складається з SEQ ID NO: 152-162. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є гемобластом, таким як множинна мієлома, гострий лімфобластний лейкоз або хронічний лімфоцитарний лейкоз. У деяких варіантах здійснення
50 даного винаходу рак є солідним раком.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування раку у індивідуума (наприклад, у людини-індивідуума), що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції, що містить: (1) сконструйовану імунну ефекторну клітину (таку як Т-клітина), що містить CD38 CAR, який містить поліпептид, що містить: (а)
55 позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD38 sdAb; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен, і (2) фармацевтично прийнятний носій, при цьому анти-BCMA sdAb містить будь-який з наступних елементів:

(25) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 64;

(26) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65;

5 (27) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66;

(28) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 43; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67;

10 (29) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68;

(30) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 45; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 57; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 69;

(31) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 58; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70;

20 (32) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 59; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 71;

(33) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 60; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 72;

25 (34) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 61; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 73;

(35) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 62; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 74; або

30 (36) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 63; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD38 sdAb є верблужим, химерним, людським або гуманізованим. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD38 sdAb містить домен V_H, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 89-100. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефektorної клітини (такої як Т-клітина). У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен. У деяких варіантах здійснення даного винаходу спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 CAR додатково містить шарнірний домен (такий як шарнірний домен CD8α), розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 CAR додатково містить сигнальний пептид (такий як сигнальний пептид CD8α), розташований на N-кінці поліпептиду. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, перший спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD28, другий спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначений поліпептид містить від N-кінця до С-кінця: сигнальний пептид CD8α, позаклітинний антигензв'язуючий домен, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий сигнальний домен, одержаний з CD137, і первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен, одержаний з CD3ζ. У деяких варіантах здійснення даного винаходу CD38 CAR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 163-174. У деяких варіантах здійснення даного винаходу

сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є гемобластомом, таким як множинна мієлома, гострий лімфобластний лейкоз або хронічний лімфоцитарний лейкоз. У деяких варіантах здійснення даного винаходу рак є солідним раком.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування захворювання (такого як рак) у індивідуума (наприклад, у людини-індивідуума), що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції, яка містить однодоменне антитіло анти-CD19 і фармацевтично прийнятний носій, причому однодоменне антитіло анти-CD19 містить три CDR: (a) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1; (b) CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2; і (c) CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3. У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD19 sdAb містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування захворювання (такого як рак) у індивідуума (наприклад, у людини-індивідуума), що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції, яка містить однодоменне антитіло анти-CD19 і фармацевтично прийнятний носій, причому однодоменне антитіло анти-CD20 містить три CDR: (a) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; (b) CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5; і (c) CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах здійснення анти-CD20 sdAb містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування захворювання (такого як рак) у індивідуума (наприклад, у людини-індивідуума), що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції, яка містить однодоменне антитіло анти-BCMA і фармацевтично прийнятний носій, при цьому анти-BCMA sdAb містить будь-який елемент з наступних:

(1) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;

(2) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30;

(3) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31;

(4) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 32;

(5) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33;

(6) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34;

(7) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35;

(8) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36;

(9) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37;

(10) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38; або

(11) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-BCMA sdAb містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 78-88.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування захворювання (такого як рак) у індивідуума (наприклад, у людини-індивідуума), що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції, яка містить

однодоменне антитіло анти-CD38 і фармацевтично прийнятний носій, при цьому анти-CD38 sdAb містить будь-який елемент з наступних: CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 64;

(1) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65;

(2) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66;

(3) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 43; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67;

(4) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68;

(5) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 45; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 57; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 69;

(6) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 58; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70;

(7) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 59; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 71;

(8) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 60; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 72;

(9) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 61; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 73;

(10) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 62; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 74; або

(11) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 63; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу анти-CD38 sdAb містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 89-100.

Способи, описані в даному документі, придатні для лікування різних видів раку, включаючи як солідний рак, так і гемобластози. Способи застосовні до раків всіх стадій, включаючи ранню стадію, пізню стадію і метастатичний рак. Способи, описані в даному документі, можна застосовувати як першу лінію терапії, другу лінію терапії, третю лінію терапії або комбіновану терапію з іншими способами лікування раку, відомими в даній галузі техніки, такими як хіміотерапія, хірургічне лікування, опромінення, генна терапія, імунотерапія, трансплантація кісткового мозку, трансплантація стовбурових клітин, таргетна терапія, кріотерапія, ультразвукова терапія, фотодинамічна терапія, радіочастотна абляція або подібне, в режимі ад'ювантного або неoad'ювантного лікування.

Введення фармацевтичних композицій можна здійснювати будь-яким зручним способом, в тому числі за допомогою ін'єкцій, вживання, трансфузії, імплантації або трансплантації. Композиції можна вводити пацієнту трансартеріально, підшкірно, внутрішньошкірно, внутрішньопухлинно, інтранодально, інтрамедулярно, внутрішньом'язово, внутрішньовенно або внутрішньочеревно. У деяких варіантах здійснення даного винаходу фармацевтичну композицію вводять системно. У деяких варіантах здійснення даного винаходу фармацевтичну композицію вводять індивідууму шляхом інфузії, такої як внутрішньовенна інфузія. Інфузійні

методику для імунотерапії добре відомі в даній галузі техніки (див., наприклад, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676 (1988)). У деяких варіантах здійснення даного винаходу фармацевтичну композицію вводять індивідууму шляхом внутрішньошкірної або підшкірної ін'єкції. У деяких варіантах здійснення даного винаходу композиції вводять шляхом внутрішньовенної ін'єкції. У деяких варіантах здійснення даного винаходу композиції вводять безпосередньо в пухлину або лімфатичний вузол. У деяких варіантах здійснення даного винаходу фармацевтичну композицію вводять місцево в область пухлини, наприклад, безпосередньо в пухлинні клітини, або тканини, які мають пухлинні клітини.

Множинна мієлома (ММ) є невиліковною агресивною злоякісною пухлиною плазми, яка класифікується як неоплазія В-клітин і яка неконтрольовано проліферує в кістковому мозку, перешкоджаючи нормальному метаболічному продукуванню клітин крові і зумовлюючи хворобливі ураження кісток (Garfall, AL et al., Discovery Med. 2014 року, 17, 37). Клінічно множинна мієлома може проявлятися гіперкальціємією, нирковою недостатністю, анемією, кістковими ураженнями, бактеріальними інфекціями, підвищеною в'язкістю крові і амілоїдозом (Robert Z. Orłowski, Cancer Cell. 2013, 24 (3)). Згідно з дослідженнями та статистикою, щорічно мієлома діагностується у приблизно 86 000 пацієнтів, при цьому приблизно 63 000 пацієнтів щорічно вмирають від ускладнень, асоційованих з цією патологією (Becker, 2011). Крім того, через старіння населення прогнозується, що число випадків мієломи буде зростати з року в рік. Як і для багатьох видів раку, щодо множинної мієломи залишається невідомою причина захворювання і не розроблено ефективне лікування. Деякі способи лікування множинної мієломи є аналогічними лікуванням інших видів раку, наприклад, хіміотерапія або променева терапія, трансплантація стовбурових клітин або трансплантація кісткового мозку, таргетная терапія або біологічна терапія (George, 2014 року). Клітинна імунотерапія на основі антитіл продемонстрували суттєву клінічну ефективність у пацієнтів з гематологічними злоякісними новоутвореннями, особливо при В-клітинній неходжкінській лімфомі. Існує потреба в ефективному імунотерапевтичному агенті для лікування множинної мієломи.

Дози і необхідна концентрація лікарського засобу в фармацевтичних композиціях за даним винаходом можуть варіюватися в залежності від конкретного застосування. Способи визначення відповідної дози або шляху введення добре відомі кваліфікованому фахівцеві. Експерименти на тваринах забезпечують надійні рекомендації для визначення ефективних доз для лікування людини. Міжвидове приведення ефективних доз можна виконати згідно з принципами, викладеними в Mordenti, J. and Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1289, pp. 42-46. В рамках даного винаходу для різних способів лікування і при різних порушеннях будуть ефективними різні склади, при цьому введення, що застосовується при лікуванні конкретного органу або тканини, може потребувати доставки за допомогою способу, відмінного від іншого способу, за допомогою якого необхідно доставити склад до іншого органу або тканини.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу, в яких фармацевтична композиція містить будь-яке однодомне антитіло, описане в даному документі, зазначену фармацевтичну композицію вводять в дозі від приблизно 10 нг/кг до приблизно 100 мг/кг ваги тіла індивідуума або більше на добу, наприклад, від приблизно 1 мг/кг/доб до 10 мг/кг/доб, в залежності від шляху введення. Рекомендації з конкретних доз і способів доставки представлені в літературі; див., наприклад, в патенті США № 4657760; 5206344; або 5225212.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу, в яких фармацевтична композиція містить будь-яку зі сконструйованих імунних клітин, описаних в даному документі, зазначену фармацевтичну композицію вводять в дозі щонайменше приблизно 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 або 10^9 клітин/кг ваги тіла індивідуума. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначену фармацевтичну композицію вводять в дозі щонайменше від приблизно 10^4 до приблизно 10^5 , від приблизно 10^5 до приблизно 10^6 , від приблизно 10^6 до приблизно 10^7 , від приблизно 10^7 до 10^8 , від приблизно 10^8 до приблизно 10^9 , від приблизно 10^4 до приблизно 10^9 , від приблизно 10^4 до приблизно 10^6 , від приблизно 10^6 до приблизно 10^8 , або від приблизно 10^5 до приблизно 10^7 клітин/кг ваги тіла індивідуума.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначену фармацевтичну композицію вводять один раз. У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначену фармацевтичну композицію вводять безліч разів (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6 або більшу кількість разів). У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначену фармацевтичну композицію вводять один раз в тиждень, один раз в 2 тижні, один раз в 3 тижні, один раз в 4 тижні, один раз на місяць, один раз в 2 місяці, один раз в 3 місяці, один раз в 4 місяці, один раз в 5 місяців, один раз в 6 місяців, один раз в 7 місяців, один раз в 8 місяців, один раз в 9 місяців або один раз на рік. У деяких

варіантах здійснення даного винаходу інтервал між введеннями становить від приблизно одного тижня до 2 тижнів, від 2 тижнів до 1 місяця, від 2 тижнів до 2 місяців, від 1 місяця до 2 місяців, від 1 місяця до 3 місяців, від 3 місяців до 6 місяців або від 6 місяців до року. Спеціаліст в галузі медицини може легко визначити оптимальну дозу і схему лікування для конкретного пацієнта шляхом моніторингу за симптомами захворювання і відповідної корекції лікування у даного пацієнта.

Крім того, дози можна вводити за допомогою одного або більшої кількості окремих введень або шляхом безперервної інфузії. При повторному введенні протягом декількох днів або довше, в залежності від стану, лікування продовжують до бажаного придушення симптомів захворювання. Однак можна використовувати й інші схеми введення доз. Ефективність лікування можна контролювати за допомогою звичайних методик і аналізів.

VII. Набори і готові вироби

У даному винаході додатково пропонуються набори, поодинокі дози і готові вироби, що містять будь-які однодоменні антитіла, химерні рецептори антигенів або сконструйовані імунні ефекторні клітини, описані в даному документі. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується набір, який містить будь-яку з описаних в даному документі фармацевтичних композицій, і переважно пропонуються інструкції для його застосування.

Набори з даного винаходу знаходяться в придатній упаковці. Придатна упаковка включає в себе, але не обмежується цим, флакони, пляшки, банки, гнучку упаковку (наприклад, герметичні майларові або пластикові пакети) тощо. У деяких випадках набори можуть містити додаткові компоненти, такі як буфери і пояснювальну інформацію. Таким чином, в даному винаході також пропонуються готові вироби, які включають в себе флакони (наприклад, герметичні флакони), пляшки, банки, гнучку упаковку тощо.

Готовий виріб може містити контейнер і етикетку, що пов'язана з контейнером або знаходиться на ньому, або листок-вкладиш в упаковку. Придатні контейнери включають, наприклад, бутлі, флакони, шприци і т.п. Контейнери можуть бути виготовлені з різних матеріалів, таких як скло або пластик. Як правило, контейнер містить композицію, яка ефективно застосовується при лікуванні захворювання або порушення (такого як рак), описаного в даному документі, і може мати стерильний вхідний отвір (наприклад, контейнер може являти собою пакет з розчином для внутрішньовенного введення або флакон з пробкою, що проколюють голкою для підшкірної ін'єкції). На етикетці або на листку-вкладиші в упаковку зазначено, що композицію застосовують для лікування конкретного патологічного стану у індивідуума. Етикетка або листок-вкладиш в упаковку повинні додатково містити інструкції щодо введення композиції індивідууму. На етикетці можуть міститися вказівки щодо введенню і/або застосування. Контейнер, що містить фармацевтичну композицію, може бути багаторазовим флаконом, який допускає повторні введення (наприклад, від 2-6 введень) відновленої композиції. У листку-вкладиші в упаковку наводяться інструкції, що в звичайному порядку включаються в комерційні упаковки терапевтичних засобів, які містять інформацію про показання, застосування, дози, введення, протипоказання і/або застереження, що стосуються застосування таких терапевтичних засобів. На додаток до цього, готовий виріб може додатково містити другий контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буферний розчин, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWF), фосфатно-сольовий буферний розчин, розчин Рінгера та розчин глюкози. Готовий виріб може включати в себе інші матеріали, що є бажаними з комерційної та споживацької точки зору, в тому числі інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприци.

Набори чи готовий виріб можуть включати в себе множину одиничних доз фармацевтичної композиції та інструкції із застосування, які упаковані в кількостях, достатніх для зберігання і застосування в аптеках, наприклад, в аптеках при клініках і аптеках, що мають рецептурно-виробничий відділ.

Приклади і типові варіанти здійснення даного винаходу, наведені нижче, призначені тільки для ілюстративних цілей і тому не повинні розглядатися як такі, що обмежують винахід будь-яким чином. Таким чином, наступні приклади і докладний опис пропонуються як ілюстрація, а не для обмеження.

ТИПОВІ ВАРІАНТИ ЗДІЙСНЕННЯ ЦЬОГО ВИНАХОДИ

Варіант здійснення 1. У деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів (CAR), що містить поліпептид, який містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, що містить перше однодоменне антитіло (sdAb), яке специфічно зв'язується з першим антигеном, і друге однодоменне антитіло (sdAb), яке специфічно зв'язується з другим антигеном; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен.

Варіант здійснення 2. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 1, перший антиген відрізняється від другого антигену.

Варіант здійснення 3. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 2, CAR є мультиспецифічним.

5 Варіант здійснення 4. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 3, CAR є біспецифічним.

Варіант здійснення 5. В деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-4, перше sdAb розташоване на N-кінці другого sdAb.

10 Варіант здійснення 6. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-4, перше sdAb розташоване на C-кінці другого sdAb.

Варіант здійснення 7. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-6, перший антиген і другий антиген вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 і гліколіпіду F77.

15 Варіант здійснення 8. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 7, перше sdAb є анти-BCMA sdAb.

Варіант здійснення 9. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 7, перше sdAb є анти-CD38 sdAb.

20 Варіант здійснення 10. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 7, перше sdAb є анти-CD19 sdAb.

Варіант здійснення 11. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 7, перше sdAb є анти-CD20 sdAb.

Варіант здійснення 12. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 7, перше sdAb є анти-CD22 sdAb.

25 Варіант здійснення 13. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 8, CAR містить позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить щонайменше дві копії анти-BCMA sdAb.

30 Варіант здійснення 14. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 9, CAR містить позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить щонайменше дві копії анти-CD38 sdAb.

Варіант здійснення 15. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 8 або за варіантом здійснення 9, перше sdAb є анти-BCMA sdAb, а друге sdAb є анти-CD38 sdAb.

35 Варіант здійснення 16. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 8 або за варіантом здійснення 10, перше sdAb є анти-BCMA sdAb, а друге sdAb є анти-CD19 sdAb.

Варіант здійснення 17. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 10 або за варіантом здійснення 11, перше sdAb є анти-CD19 sdAb, а друге sdAb є анти-CD20 sdAb.

40 Варіант здійснення 18. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 10 або за варіантом здійснення 12, перше sdAb є анти-CD19 sdAb, а друге sdAb є анти-CD22 sdAb.

Варіант здійснення 19. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-14, перший антиген є таким же, як і другий антиген.

45 Варіант здійснення 20. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 19, CAR є двовалентним або тривалентним.

Варіант здійснення 21. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 19 або за варіантом здійснення 20, перше sdAb і друге sdAb специфічно зв'язуються з одним і тим же епітопом.

50 Варіант здійснення 22. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 21, перше sdAb є таким же, як друге sdAb.

Варіант здійснення 23. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 19 або за варіантом здійснення 20, перше sdAb і друге sdAb специфічно зв'язуються з різними епітопами.

55 Варіант здійснення 24. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 8, 13, 15, 16 і 19-23, анти-BCMA sdAb містить одну з наведених нижче областей:

60 (1) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;

(2) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30;

5 (3) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31;

(4) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 32;

10 (5) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33;

15 (6) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34;

(7) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35;

20 (8) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36;

(9) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37;

25 (10) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38; або

30 (11) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39.

Варіант здійснення 25. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 24, анти-BCMA sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 78-88.

35 Варіант здійснення 26. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 9, 14, 15 і 19-23, анти-CD38 sdAb містить одну з наведених нижче областей:

(1) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 64;

40 (2) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65;

45 (3) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66;

(4) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 43; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67;

50 (5) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68;

(6) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 45; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 57; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 69;

55 (7) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 58; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70;

60 (8) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 59; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 71;

(9) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 60; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 72;

5 (10) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 61; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 73;

(11) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 62; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 74; або

10 (12) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 63; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75.

15 Варіант здійснення 27. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 26, анти-CD38 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 89-100.

Варіант здійснення 28. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 10 і 16-23, анти-CD19 sdAb містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3.

20 Варіант здійснення 29. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 28, анти-CD19 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76.

25 Варіант здійснення 30. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 11, 17 і 19-23, анти-CD20 sdAb містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6.

Варіант здійснення 31. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 30, анти-CD20 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77.

30 Варіант здійснення 32. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-31, перше sdAb і/або друге sdAb є верблужим, химерними, людськими або гуманізованими.

Варіант здійснення 33. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-32, перше sdAb і друге sdAb є безпосередньо злитими один з одним за допомогою пептидного зв'язку.

35 Варіант здійснення 34. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-32, перше sdAb і друге sdAb є злитими одне з одним за допомогою пептидного лінкера.

40 Варіант здійснення 35. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 34, пептидний лінкер має довжину не більше ніж приблизно 50 амінокислот.

Варіант здійснення 36. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 35, пептидний лінкер містить амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 144-151.

45 Варіант здійснення 37. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло анти-CD19 (sdAb), що містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3.

50 Варіант здійснення 38. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 37, анти-CD19 sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76.

Варіант здійснення 39. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD19 sdAb за спрощеним варіантом здійснення 37 або за варіантом здійснення 38; 55 (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен.

Варіант здійснення 40. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло (sdAb) анти-CD20, який містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6.

Варіант здійснення 41. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 40, анти-CD20 sdAb містить домен V_HH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77.

Варіант здійснення 42. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів, що містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD20 sdAb за спрощеним варіантом здійснення 40 або за варіантом здійснення 41; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен.

Варіант здійснення 43. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло (sdAb) анти-BCMA, що містить будь-яку з наступних областей:

(1) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;

(2) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30;

(3) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31;

(4) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 32;

(5) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33;

(6) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34;

(7) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35;

(8) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36;

(9) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37;

(10) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38; або

(11) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39.

Варіант здійснення 44. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 43, анти-BCMA sdAb містить домен V_HH, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 78-88.

Варіант здійснення 45. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів, що містить: (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-BCMA sdAb за спрощеним варіантом здійснення 43 або за варіантом здійснення 44; (b) трансмембранний домен; і (c) внутрішньоклітинний сигнальний домен.

Варіант здійснення 46. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується однодоменне антитіло (sdAb) анти-CD38, що містить CDR, яка містить одну з наведених нижче областей:

(1) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 64;

(2) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65;

(3) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66;

5 (4) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 43; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67;

(5) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 68;

10 (6) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 45; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 57; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 69;

15 (7) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 58; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 70;

(8) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 59; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 71;

20 (9) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 60; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 72;

(10) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 61; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 73;

25 (11) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 62; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 74; або

30 (12) CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 63; і CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 75.

Варіант здійснення 47. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 46, анти-BCMA sdAb містить домен V_H, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 89-100.

35 Варіант здійснення 48. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів, що містить: (а) позаклітинний антигензв'язуючий домен, який містить анти-CD38 sdAb за спрощеним варіантом здійснення 46 або за варіантом здійснення 47; (b) трансмембранний домен; і (с) внутрішньоклітинний сигнальний домен.

40 Варіант здійснення 49. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-36, 39, 42, 45 і 48, трансмембранний домен є похідним від молекули, вибраної з групи, що складається з CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 і PD1.

Варіант здійснення 50. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 49, трансмембранний домен є похідним від CD8 або CD28.

45 Варіант здійснення 51. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 50, трансмембранний домен містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 132 або SEQ ID NO: 133.

Варіант здійснення 52. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-36, 39, 42, 45 і 48-51, внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефекторної клітини.

50 Варіант здійснення 53. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 52, первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3ζ.

55 Варіант здійснення 54. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 53, внутрішньоклітинний сигнальний домен містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 140 або SEQ ID NO: 141.

Варіант здійснення 55. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-36, 39, 42, 45 і 48-54, внутрішньоклітинний сигнальний домен містить спів-стимулюючий сигнальний домен.

60 Варіант здійснення 56. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 55, спів-стимулюючий сигнальний домен є похідним від спів-

стимулюючої молекули, вибраної з групи, що складається з CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лігандів CD83 і їх комбінацій.

5 Варіант здійснення 57. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 56, спів-стимулюючий сигнальний домен містить цитоплазматичний домен CD28 і/або цитоплазматичний домен CD137.

Варіант здійснення 58. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 57, спів-стимулюючий сигнальний домен містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 136 і/або SEQ ID NO: 137.

10 Варіант здійснення 59. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-36, 39, 42, 45 і 48-58, CAR додатково містить шарнірний домен, розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену.

Варіант здійснення 60. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 59, шарнірний домен є похідним від CD8α.

15 Варіант здійснення 61. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 60, шарнірний домен містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 130.

20 Варіант здійснення 62. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-36, 39, 42, 45 і 48-61, CAR додатково містить сигнальний пептид, розташований на N-кінці поліпептиду.

Варіант здійснення 63. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 62, сигнальний пептид є похідним від молекули, вибраної з групи, що складається з CD8, ГМКСФ-рецептора α і важкого ланцюга IgG1.

25 Варіант здійснення 64. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 63, сигнальний пептид є похідним від CD8α.

Варіант здійснення 65. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 64, сигнальний пептид містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 127.

30 Варіант здійснення 66. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується химерний рецептор антигенів, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 152-174, 198-201, 206-216, 248-249, 257-260 і 265-270.

Варіант здійснення 67. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 76-100, 152-174, 198-201, 206-216, 248-249, 257-260 і 265-270.

35 Варіант здійснення 68. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується виділена нуклеїнова кислота, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує CAR за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-36, 39, 42, 45 і 48-66.

40 Варіант здійснення 69. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 68, послідовність нуклеїнової кислоти вибирають з групи, що складається з SEQ ID NO: 175-197, 202-205, 217-227, 250-251, 261-264 і 271-276.

45 Варіант здійснення 7. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 68 або за варіантом здійснення 69, виділена нуклеїнова кислота додатково містить послідовність другої нуклеїнової кислоти, яка кодує другий CAR, при цьому послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує CAR, функціонально пов'язана з послідовністю другої нуклеїнової кислоти за допомогою послідовності третьої нуклеїнової кислоти, яка кодує саморозщеплюваний пептид.

Варіант здійснення 71. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 70, саморозщеплюваний пептид вибирають з групи, що складається з T2A, P2A і F2A.

50 Варіант здійснення 72. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 71, послідовність третьої нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 255.

Варіант здійснення 73. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 68-72, виділена нуклеїнова кислота є молекулою РНК.

55 Варіант здійснення 74. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується вектор, що містить виділену нуклеїнову кислоту за будь-яким одним з варіантів здійснення 68-72.

Варіант здійснення 75. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 74, вектор є експресійним вектором.

60 Варіант здійснення 76. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 74 або за варіантом здійснення 75, вектор є вірусним вектором.

Варіант здійснення 77. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 76, вектор є лентівірусним вектором.

Варіант здійснення 78. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується сконструйована імунна ефекторна клітина, яка містить CAR за будь-яким одним з варіантів здійснення 1-36, 39, 42, 45 і 48-66, і виділену нуклеїнову кислоту за будь-яким одним з варіантів здійснення 68-73, або вектор за будь-яким одним з варіантів здійснення 74-77.

Варіант здійснення 79. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 78, імунна ефекторна клітина є Т-клітиною, НК-клітиною, моноклеарною клітиною периферичної крові (МКПК), гемопоетичною стовбуровою клітиною, плюрипотентною стовбуровою клітиною або ембріональною стовбуровою клітиною.

Варіант здійснення 80. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 79, імунна ефекторна клітина є Т-клітиною.

Варіант здійснення 81. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується фармацевтична композиція, що містить сконструйовану імунну ефекторну клітину за будь-яким одним з варіантів здійснення 78-80, і фармацевтично прийнятний носій.

Варіант здійснення 82. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування раку у індивідуума, що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції за прискореним варіантом здійснення 81.

Варіант здійснення 83. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 82, сконструйована імунна ефекторна клітина є аутологічною.

Варіант здійснення 84. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 82, сконструйована імунна ефекторна клітина є аллогенною.

Варіант здійснення 85. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 82-84, рак є гемобластомомом.

Варіант здійснення 86. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 85, рак є множинною мієломою, гострим лімфобластним лейкозом або хронічним лімфоцитарним лейкозом.

Варіант здійснення 87. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за будь-яким одним з варіантів здійснення 82-84, рак є солідним раком.

Варіант здійснення 88. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується фармацевтична композиція, що містить анти-CD19 sdAb за спрощеним варіантом здійснення 37 або за варіантом здійснення 38, і фармацевтично прийнятний носій.

Варіант здійснення 89. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується фармацевтична композиція, що містить анти-CD20 sdAb за спрощеним варіантом здійснення 40 або за варіантом здійснення 41, і фармацевтично прийнятний носій.

Варіант здійснення 90. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується фармацевтична композиція, що містить анти-BCMA sdAb за спрощеним варіантом здійснення 43 або за варіантом здійснення 44, і фармацевтично прийнятний носій.

Варіант здійснення 91. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується фармацевтична композиція, що містить анти-CD38 sdAb за спрощеним варіантом здійснення 46 або за варіантом здійснення 47, і фармацевтично прийнятний носій.

Варіант здійснення 92. В деяких варіантах здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування захворювання у індивідуума, що включає введення індивідууму ефективної кількості фармацевтичної композиції за будь-яким одним з варіантів здійснення 88-91.

Варіант здійснення 93. У деяких додаткових варіантах здійснення даного винаходу за спрощеним варіантом здійснення 92, захворювання є раком.

ПРИКЛАДИ

Наведені в даному документі приклади не призначені для подання того, що експерименти, наведені нижче, це все експерименти, які проводилися. Вжито заходів для забезпечення точності стосовно застосовуваних чисел (наприклад, кількостей, температури і т.д.), але слід враховувати наявність деяких експериментальних похибок і відхилень. Якщо не вказано інше, частини є масовими частинами, молекулярна маса є середньою молекулярною масою, температура представлена в градусах Цельсія, а тиск дорівнює або приблизно відповідає атмосферному.

Приклад 1. Одержання однодомених антитіл

З метою розробки однодомених антитіл з високою афінністю зв'язування із зазначеними антигенами імунізували лам і створювали бібліотеку фагового дисплея для ідентифікації лідерів V_HH. Окремі клони довільно збирали і класифікували згідно із областю 3 (CDR3), що визначає компліментарність, важкого ланцюга, яка може відігравати важливу роль в зв'язуванні антигену

Для одержання однодомених антитіл, лам регулярно імунізували відповідними імуногенами, які могли включати в себе рекомбінантний білок ВСМА людини, що має С-кінцевий Fc-тер (ACRO Biosystems, Cat No.: BC7-H5254), рекомбінантний білок CD38 людини, що має С-кінцевий His-тер (ACRO Biosystems, Cat No.: CD8-H5224), рекомбінантний білок CD19 людини, що має С-кінцевий Fc-тер (ACRO Biosystems, Cat No.: CD9-H5229) і рекомбінантний білок CD20 людини, що має С-кінцевий Fc-тер (ACRO Biosystems, Cat No.: CD0-H526a).

Нижче описаний спосіб одержання однодомених антитіл анти-ВСМА як приклад одержання однодомених антитіл проти різних антигенів. Генерування однодомених антитіл проти CD38 людини, проти CD19 людини і проти CD20 проводили за допомогою аналогічних процесів, як описано нижче. Інші протоколи одержання однодомених антитіл описані в літературі. Див., наприклад, Els Pardon et al, Nature Protocol, 2014; 9 (3): 674.

1. Імунізація тварин і аналіз імунної відповіді

1. 1 Імунізація тварин.

Кожен імуноген, що містить рекомбінантний антигенний білок, змішували з ад'ювантом або PBS і вводили ламі. Тварин імунізував представник компанії-постачальника (Cedarline) сім разів, як правило, застосовуючи щоразу 200 мкг імуногену і CFA (повний ад'ювант Фрейнда) з інтервалом від 1 тижня до 2 тижнів. Зразки периферичної крові збирали на етапі попередньої імунізації і після 5-ї і 7-ї імунізації. Після декількох циклів імунізації у лам оцінювали імунні відповіді на цільовий антиген з метою визначення титру антигенспецифічних однодомених антитіл. Лімфоцити виділяли за допомогою градієнтного центрифугування з приблизно 100 мл периферичної крові. Клітини доповнювали RNALATER™ і зберігали при -80 °C. Сироватки одержували за допомогою центрифугування зразків антикоагульованої крові і зберігали при -80 °C.

1. 2 Фракціонування IgG

Фракціонування IgG на підкласи проводили згідно з типовою робочою інструкцією GenScript. Підкласи IgG фракціонували з сироватки термінальної крові із застосуванням іонітів Protein G і Protein A. Зразок 1 мл сироватки поміщали в колонку 1 мл HITRAP® Protein G HP і промивали колонку за допомогою 10 мл фосфатного буфера (20 mM, pH 7,0). Фракцію IgG3 (MM 100 000 Da) елюювали за допомогою 0,15 M NaCl, 0,58 % оцтовою кислотою (pH 3,5) і нейтралізували елюат за допомогою 1 M Тріс-HCl (pH 9,0) до pH 7,4. Потім фракцію IgG1 (MM 170,000 Da) елюювали за допомогою 0,1 M гліцин-HCl (pH 2,7) і нейтралізували елюат за допомогою 1 M Тріс-HCl (pH 8,5) до pH 7,4. Фільтрат колонки HITRAP® Protein G HP поміщали в колонку 1 мл HITRAP® Protein A HP, і промивали колонку за допомогою 10 мл фосфатного буфера (20 mM, pH 7,0). Фракцію IgG2 (MM 100 000 Da) елюювали за допомогою 0,15 M NaCl, 0,58 % оцтовою кислотою (pH 4,5) і нейтралізували елюат за допомогою 1 M Тріс-HCl (pH 9,0) до pH 7,4. Концентрації очищених антитіл IgG1, IgG2 і IgG3 визначали за допомогою OD280, а ступінь чистоти кожного з них оцінювали за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу як у відновлюваних, так і у невідновлюваних умовах.

1. 3. Аналіз імунної відповіді

Імунну відповідь у лам оцінювали за допомогою ELISA, в якому зразки сироватки і очищені IgG аналізували на предмет зв'язування з іммобілізованими імуногенами. Оцінювали зразки сироваток, зібрані перед імунізацією, після 5-ї імунізації і одержані з термінальної крові. Антиген (тобто, рекомбінантний білок антигену людини) розбавляли в покриваючому буфері при концентрації 4 мкг/мл. Мікротитрувальний планшет покривали розведеним антигеном при 4 °C на ніч. Потім планшет промивали 3 рази промивним буфером з подальшим блокуванням при кімнатній температурі протягом 2 годин. Після цього планшет промивали 4 рази промивним буфером. Серії розбавлених сироваток або IgG додавали на планшет і інкубували при кімнатній температурі протягом 1,5 годин. Потім планшет промивали 4 рази промивним буфером. HRP-кон'юговане вторинне анти-ламус антитіло IgG додавали на планшет та інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після промивання в кожну лунку додавали субстрат ТМБ та інкубували протягом 10 хвилин перед зупинкою за допомогою 1 M HCl. Для кількісного визначення зв'язування поглинання для кожної лунки вимірювали при 450 нм за допомогою спектрометра МКЗ.

2. V_HN конструкція бібліотеки фагів дисплеїв

2. 1 Екстракція РНК

Загальну РНК екстрагували з ізолюваних лімфоцитів (з 1. 1. 1) за допомогою реагенту TRIZOL® згідно з протоколом виробника. Кількість і якість загальної РНК оцінювали за допомогою гель-електрофорезу і визначали кількісно шляхом вимірювання поглинання при OD260/280.

2. 2 Від-ПЛР і ампліфікація V_HN

Загальну РНК піддавали зворотній транскрипції в кДНК із застосуванням оліго(dT)₂₀ праймера за допомогою набору для синтезу 1-го ланцюга кДНК PRIMESCRIPT™ згідно з протоколом виробника. Для посилення фрагментів V_HH розроблені шість прямих і два зворотних специфічних вироджених праймери, які мали дві ділянки рестрикції BglI. Фрагменти V_HH ампліфікували згідно з типовою робочою інструкцією (SOP) GenScript, як описано нижче.

Варіабельні області важкого ланцюга імуноглобуліну (тобто, V_HH) ампліфікували за допомогою двоетапної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). У першій ПЛР 100 нг матриці кДНК змішували з праймерами CALL001 (SEQ ID NO: 229) і CALL002 (SEQ ID NO: 230). Продукти ДНК з першої реакції ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Після виділення з гелю продукти ДНК першої ПЛР застосовували як матриці в другій ПЛР. Другу ПЛР виконували з праймерами BACK-1 (SEQ ID NO: 231), BACK-2 (SEQ ID NO: 232) і PMCF (SEQ ID NO: 233). Ампліфіковані продукти другої ПЛР, що містять ПЛР-фрагменти V_HH, виділяли з гелю і розщеплювали за допомогою ферменту, а потім вводили в плазмідні фагмідів. Реконбінантні плазмідні фагмідів гена V_HH за допомогою електричної сили переносили в клітини E. coli для створення фагового дисплея імунної бібліотеки V_HH.

Процедура реакції ПЛР має початковий етап денатурації при 94 °C протягом 7 хв, з подальшими 30 циклами при 94 °C протягом 1 хв, 55 °C протягом 1 хв, і 72 °C протягом 1 хв; після цього – кінцевий етап подовження при 72 °C протягом 7 хв.

2. 3 Конструкція фагової бібліотеки

Продукти ПЛР V_HH одержували шляхом ампліфікації із застосуванням різних пар праймерів. Потім продукти ПЛР розщеплювали за допомогою BglI і виділяли з гелю. Виділені з гелю фрагменти вставляли в фагмідний вектор власної розробки GenScript. Для оптимізації умов лігування і трансформації сконструювали експериментальну бібліотеку. Для розробки бібліотеки фагмідів застосовували оптимізовані умови лігування і трансформації. Невелику частину трансформованих клітин розбавляли і просівали на 2×YT планшетах, доповнених 100 мкг/мл ампіциліну. З метою розрахунку розміру бібліотеки, колонії підраховували. Для оцінки якості бібліотеки випадковим чином вибирали і секвенували позитивні клони. Решту трансформованих клітин просівали на планшетах YT, доповнених 100 мкг/мл ампіциліну і 2 % глюкози. "Газони" колоній зіскоблювали з планшетів. Для виділення плазмідів з бібліотеки застосовували невелику аліквоту клітин. Решту клітин доповнювали гліцериним і зберігали при -80 °C як запас.

3. Пеннінг фагового дисплея

3. 1 Біо-пеннінг

Сконструювану фагіву бібліотеку V_HH піддавали пеннінгу на предмет реконбінантного білка ВСМА людини і клітин CHO, які експресують ВСМА людини (тобто, CHO-ВСМА, власної розробки компанії Legend Biotec) відповідно, користуючись типовою робочою інструкцією, розробленою компанією GenScript. Запас бібліотеки вирощували до логарифмічної фази, після чого бібліотеку звільняли за допомогою фагу-хелпера M13KO7 і ампліфікували протягом ночі при 25 °C в шейкері. Потім фаг осаджували за допомогою PEG/NaCl, знову суспендували в PBS і зберігали при -80 °C. Для твердофазного пеннінгу лунки мікропланшетів покривали реконбінантним білком ВСМА людини в PBS при 4 °C на ніч. Для рідкофазного пеннінгу клітини CHO-ВСМА блокували за допомогою блокуючого буфера при кімнатній температурі протягом 1 години. На етапі покривання або блокування фагів частинки попередньо інкубували з блокуючим буфером і контрольним білком Fc в лунках мікропланшетів. Після попередньої інкубації фагів частинки додавали в лунки, покриті білками ВСМА або розчином CHO-ВСМА, і інкубували протягом 1 години. Після інкубації незв'язані і неспецифічно зв'язані фаги вимивали шляхом шестиразового промивання лунок або клітин CHO-ВСМА за допомогою PBST з двома додатковими промиваннями за допомогою PBS. Зв'язані фагові частинки елюювали за допомогою 100 мМ триетиламіну (TEA), а елюат нейтралізували за допомогою 1 M Tris-HCl (pH 7,4). Половину елюата потім застосовували для інфікування експоненціально зростаючих TG1 клітин E. coli (OD₆₀₀=0. 4 ~ 0. 6) для початкового титрування.

3. 2 Аналіз ELISA для фагу

Аналіз ELISA для фагу проводили з метою ідентифікації клонів, специфічних для антигенів-мішеней. Окремі клони одержаного фагу вирощували в 96-лунковому планшеті і звільняли за допомогою фагу-хелпера M13KO7 протягом ночі. Для ідентифікації клонів, які зв'язуються з білками антигену, 96-лункові мікротитрувальних планшети для ELISA покривали реконбінантним білком ВСМА людини і контрольним білком Fc відповідно в покриває буфері протягом ночі при 4 °C, після чого планшети блокували за допомогою блокуючого буфера. Після блокування, на планшети додавали приблизно 50 мкл на лунку фагового супернатанту з культури клітин, вирощеної протягом ночі, для 1,5-годинної інкубації при 4 °C. Планшети промивали чотири рази і додавали на планшети кон'юговане з HRP моноклональне антитіло

анти-M13 для 45-хвилинної інкубації при 4 °C. Планшети знову промивали п'ять разів, і в лунки додавали розчин субстрату для дозрівання. Для кожної лунки вимірювали абсорбцію при 450 нм.

Для ідентифікації клонів, які зв'язують клітини CHO-BCMA, клітини CHO-BCMA блокували за допомогою блокуючого буфера при кімнатній температурі протягом 1 години. Після блокування, до розчинів клітин додавали приблизно 20 мкл на лунку фагового супернатанту з культури клітин, вирощеної протягом ночі, для 1-годинної інкубації при кімнатній температурі. Після чотириразового промивання клітин кон'юговане з HRP моноклональне антитіло анти-M13 додавали для 30-хвилинної інкубації при кімнатній температурі. Клітини промивали п'ять разів, і після цього додавали розчин субстрату для дозрівання. Абсорбцію вимірювали при 450 нм.

Після пеннінгу, ідентифікували позитивні поодинокі клони в аналізі ELISA для фагу, і з одержаного фагу готували ДНК за допомогою наборів для екстракції плазмід. Вставки в плазмідах секвенували. Для кожного антигену-мішені одержували одну або декілька послідовностей V_HH. див., наприклад, Таблицю 2.

Приклад 2. Одержання моноспецифічних химерних антигенних рецепторів V_HH

Каркасна послідовність CAR, яка кодує каркасний поліпептид CAR, містить від N-кінця до C-кінця: шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD28, цитоплазматичний домен CD28, цитоплазматичний домен CD137 і цитоплазматичний домен CD3ζ, які хімічно синтезовані і клоновані в попередньо модифікований лентівірусний вектор, розташований по ходу транскрипції, і функціонально зв'язані з конститутивним hEF1α-промотором. Одержаний каркасний вектор CAR був названий "PLLV-hEF1α-8281373". Множинні сайти клонування (MCS) у векторі дозволили вставити послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить послідовність Kozak (SEQ ID NO: 26), функціонально зв'язану з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує сигнальний пептид CD8α, злитий з N-кінцем фрагмента V_HH з вектором PLLV-hEF1α- 8281373, розташованим проти ходу транскрипції і функціонально зв'язаних із каркасною послідовністю CAR.

Для побудови моноспецифічного CAR, що має одиночний домен V_HH, за допомогою каркаса PLLV-hEF1α-8281373, послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує домен V_HH, функціонально зв'язували з 3'-нуклеотидною послідовністю, що кодує сигнальний пептид CD8α. Послідовність зливої нуклеїнової кислоти хімічно синтезували і клонували в каркас PLLV-hEF1α-8281373 CAR за допомогою ділянок рестрикції EcoRI (SEQ ID NO: 234: 5'-GAATTC-3') і SpeI (SEQ ID NO: 235: 5'-ACTAGT-3') за допомогою молекулярних методів клонування, відомих в даній галузі техніки. У таблиці 4 перераховані вектори, які були сконструйовані для експресії типових моноспецифічних, моновалентних анти-BCMA і анти-CD38 CAR.

Для зручності подальшого вбудовування додаткових послідовностей, таких як нуклеотид, який кодує другий V_HH, при проектуванні конструкції моноспецифічного CAR (наприклад, анти-BCMA або анти-CD38), ділянки рестрикції, включаючи HpaI (SEQ ID NO: 236: 5'-GTTAAC-3'), MluI (SEQ ID NO: 237: 5'-ACGCGT-3'), NsiI (SEQ ID NO: 238: 5'-ATGCAT-3') ділянки були включені між послідовністю нуклеїнової кислоти сигнального пептиду CD8α і послідовністю нуклеїнової кислоти V_HH.

Упаковану суміш плазмід лентівірусу, що включає pCMV-ΔR-8,74 і pMD2. G (Addgene # 12259), попередньо змішували з векторами PLLV-hEF1α-8281373, що мають фрагменти V_HH (Таблиця 4) в попередньо оптимізованому співвідношенні з полієфірмідом (PEI), потім належним чином примушували та інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Потім трансфекційну суміш додавали по краплях до клітин HEK293 і обережно перемішували. Потім клітини інкубували протягом ночі в інкубаторі для клітин при 37 °C і 5 % CO₂. Супернатанти збирали після центрифугування при 4 °C, 500 г протягом 10 хв.

Вірусомвісні супернатанти фільтрували через 0,45 мкм PES-фільтр з подальшим ультрацентрифугуванням для концентрування лентівірусів. Після ультрацентрифугування супернатанти обережно відокремлювали, а вірусні гранули акуратно ополіскували попередньо охолодженим DPBS. Вірус належним чином аліквотували, а потім відразу ж заморожували для зберігання при -80 °C. Титр вірусу визначали на основі p24 за допомогою набору HTRF, розробленого компанією GenScript.

Одержання МКПК

Лейкоцити збирали зі здорових донорів шляхом аферезу, і доводили концентрацію клітин до 5×10⁶ клітин/мл в середовищі R10. Потім лейкоцити змішували з 0,9 % розчином NaCl при співвідношенні 1:1 (об./об.). У 15 мл центрифугову пробірку додавали 3 мл середовища Lymphorger і повільно додавали 6 мл розведеної суміші лімфоцитів на поверхню середовища Lymphorger. Суміш лімфоцитів центрифугували при 800 г протягом 30 хвилин без перерв при 20 °C. Потім лімфоцитарну плівку збирали за допомогою піпетки 200 мкл. Зібрану фракцію

розбавляли щонайменше в 6 разів 0,9 % NaCl або R10 для зменшення щільності розчину. Зібрану фракцію потім центрифугували при 250 g протягом 10 хвилин при 20 °C. Супернатант повністю аспіредфкб і до осаджених клітин додавали 10 мл R10 для ресуспендування клітинного осаду. Суміш потім центрифугували при 250 g протягом 10 хвилин при 20 °C. Супернатант знову аспірували. В осажені клітини додавали 2 мл попередньо нагрітого до 37 °C R10 з 100 МО/мл IL-2, і клітинний осад делікатно ресуспендували. Число клітин визначали після фарбування трипановим синім, і цей зразок МКПК був готовий для подальших експериментів.

Очищення Т-клітин

Т-клітини людини очищали від МКПК за допомогою набору для виділення Т-клітин Miltenyi Pan (Miltenyi Pan T cell isolation kit) (Cat # 130-096-535) згідно з протоколом виробника, як описано нижче. В першу чергу визначали число клітин і суспензію клітин центрифугували при 300 g протягом 10 хвилин. Потім супернатант аспірували повністю, а клітинні гранули повторно суспендували в 40 мкл буфера на 10^7 загальної кількості клітин. 10 мкл суміші Т-клітинного біотину і антитіла Pan (Pan T Cell Biotin-Antibody Cocktail) додавали на 10^7 загальної кількості клітин, ретельно перемішували і інкубували протягом приблизно 5 хвилин в холодильному апараті (2~8 °C). Потім додавали 30 мкл буфера на 10^7 загальної кількості клітин. 20 мкл суміші Т-клітинних мікрогранул Pan (Pan T Cell MicroBead Cocktail) додавали на 10^7 клітин. Суміш суспензії клітин добре перемішували і інкубували протягом ще 10 хвилин в холодильному апараті (2~8 °C). Для розділення в магнітному полі потрібно мінімум 500 мкл. Для розділення в магнітному полі колонку LS поміщали в магнітне поле відповідного сепаратора MACS. Колонку готували шляхом промивання 3 мл буфера. Суспензію клітин потім наносили на колонку і збирали фільтрат, що містить немічені клітини, які представляли собою фракції збагачених Т-клітин. Додаткові Т-клітини одержували шляхом промивання колонки 3 мл буфера і збирання немічених клітин, які потрапляли в фільтрат. Як і в попередньому випадку, ці немічені клітини представляли собою збагачені Т-клітини і були об'єднані з фільтратом, одержаним на попередньому етапі. Об'єднані збагачені Т-клітини потім центрифугували і повторно суспендували в R10+100 МО/мл IL-2.

Підготовлені Т-клітини потім попередньо активували протягом 48-96 годин за допомогою набору для активації/розмноження Т-клітин людини (Miltenyi # 130-091-441) згідно з протоколом виробника, в якому частинки MACSiBead анти-CD3/CD28 додавали в співвідношенні "гранула-клітина" 1: 2.

Попередньо активовані Т-клітини трансдукували лентівірусним матеріалом в присутності 7 мкг/мл полібрену шляхом центрифугування при 1200 g, 32 °C протягом 1,5 год. Трансдуковані клітини потім переносили в інкубатор для клітинної культури з метою експресії трансгену в придатних умовах.

На день 3 або день 7 після трансдукції трансдуковані Т-клітини збирали і спільно інкубували з пухлинними клітинами протягом 20 годин при співвідношенні ефекторних клітин (CAR-T) і клітин-мішеней 20:1. Клітинами-мішенями були або лінія клітин множинної мієломи людини RPMI8226.Luc, або лінія клітин гліобластоми людини U87MG.Luc, при цьому обидві лінії клітин були сконструйовані на власній базі для експресії люциферази світлячків. Для аналізу цитотоксичності CAR-T, спрямованої на пухлинні клітини, реагенти для аналізу люмінесценції люциферази One-glo (Promega # E6110) готували згідно із протоколом виробника і додавали до спільно культованих клітин для виявлення залишкової активності люциферази в лунці. Оскільки люцифераза експресується тільки в клітинах RPMI8226.Luc або U87MG.Luc, то залишкова активність люциферази в лунці безпосередньо корелює з кількістю життєздатних клітин-мішеней в лунці. Максимальну активність люциферази одержували шляхом додавання культуральної середовища до клітин-мішеней під час відсутності ефекторних клітин. Мінімальну активність люциферази визначали додаванням Triton X-100 при кінцевій концентрації 1 % в той момент, коли починали дослідження цитотоксичності. Специфічну цитотоксичність розраховували за формулою: Специфічна цитотоксичність % = $100 \% \cdot (1 - (RLU_{\text{зразка}} - RLU_{\text{min}}) / (RLU_{\text{max}} - RLU_{\text{min}}))$.

Моноспецифічні клони CAR, націлені на BCMA (CD269), кодували, починаючи з цифр "269", в той час як моноспецифічні клони CAR, націлені на CD38, кодували аналогічно, починаючи з цифр "38". Як показано на ФІГ. 2А, відібрані клони проявляли різні рівні цитотоксичності на лінії клітин множинної мієломи RPMI8226.Luc. з більш ніж 60 % моноспецифічних CAR-T на основі V_HH, що демонструють > 50 % цитотоксичності, що спрямована на клітини RPMI8226.Luc. Клон CAR-T на основі 269A37346, 269A37348, 269A37353, 269A37355, 38A37326, 38A37331, 38A37717 і 38A37719 відбирали для подальшого дослідження. Зокрема, клони CAR-T на основі 269A37346, 269A37348, 267A37353, 269A37355, 38A37326, 38A37331, 38A37717 проявляли сильну цитотоксичність на лінію клітин множинної мієломи RPMI8226.Luc з більш ніж 20 %-30 %

підвищенням рівня загибелі клітин RPMI8226.Luc, що зумовлена CAR-T, в порівнянні з нетрансдукованими контрольними Т-клітинами (UnT). Проте, таке підвищення цитотоксичності не спостерігали на лінії клітин гліобластоми людини U87MG.Luc (див. ФІГ. 2В). Не виявлено ніяких достовірних ефектів цитотоксичності, які проявляються моноспецифічними CAR-T-клітинами на основі V_HH, на клітини U87MG.Luc, в порівнянні з контрольними UnT. Спостереження, описані вище, продемонстрували, що деякі з цих клонів можуть бути цілеспрямованими і мають вплив на BCMA- або CD38-позитивні клітини.

Приклад 3. Одержання типових біспецифічних або полівалентних химерних антигенних рецепторів

Потенційно активні клони, як описано в Прикладі 2, також можуть бути належними кандидатами для генерації біспецифічних або полівалентних CAR на основі V_HH. Два репрезентативних клони V_HH (анти-BCMA V_HH клон 269A37346 і анти-CD38 V_HH клон 38A37717) були відібрані для побудови різних типових конструкцій CAR.

BCMA × CD38 CAR на основі V_HH можуть бути згенеровані шляхом комбінування V_HH, специфічних для BCMA, і V_HH, специфічних для CD38, за допомогою придатного пептидного лінкера (наприклад, полімеру Gly-Ser), з подальшою вставкою каркасного вектора сигнального домену CAR. Типові біспецифічні конструкції BCMA × CD38 CAR (GSI5001-GSI5010) наведені в Таблиці 6. Спочатку амінокислотну послідовність анти-BCMA V_HH і анти-CD38 V_HH зв'язували разом за допомогою лінкера Gly-Ser, який може мати різну довжину. Потім зв'язану амінокислотну послідовність поміщали після послідовності сигнального пептиду CD8. Цю комбіновану послідовність, що включає в себе сигнальний пептид Kozak-CD8α і біспецифічний V_HH, безпосередньо синтезували і клонували в каркас PLLV-hEF1α-81373 CAR за допомогою ділянок рестрикції EcoRI and SpeI, згідно із загальноприйнятими протоколами молекулярного клонування, відомими в даній галузі техніки. Каркасна послідовність CAR, що кодує каркасний поліпептид CAR, містить від N-кінця до С-кінця: шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, цитоплазматичний домен CD137 і цитоплазматичний домен CD3ζ, які хімічно синтезовані і клоновані в попередньо модифікований лентівірусний вектор, розташований по ходу транскрипції, і функціонально зв'язані з конститутивним hEF1α-промотором. Одержаний каркасний вектор CAR був названий "PLLV-hEF1α-81373".

Крім того, типовий вектор коекспресії, що кодує BCMA CAR і CD38 CAR, конструювали шляхом комбінування CAR на основі V_HH, специфічного для BCMA, і CAR на основі V_HH, специфічного для CD38, в одному векторі CAR за допомогою придатного лінкера на основі сплайсингу (T2A, P2A або F2A). Наприклад, конструкція GSI5013 має послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 239. Послідовність нуклеїнової кислоти в GSI5013 кодує від 5' до 3' кінця: сигнальний пептид CD8α, 38A37717 V_HH, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий домен CD137, цитоплазматичний сигнальний домен CD3ζ, T2A, сигнальний пептид CD8α, 269A37346 V_HH, шарнірний домен CD8α, трансмембранний домен CD8α, спів-стимулюючий домен CD137 і цитоплазматичний сигнальний домен CD3α.

Полівалентні V_HH CAR можна сконструювати шляхом введення послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує декілька копій одного V_HH, злитого з кожним іншим за допомогою пептидних лінкерів, в каркасний вектор сигнального домену CAR. Типові полівалентні конструкції CAR (GSI5014, GSI5015, GSI5016, GSI5017) наведені в Таблиці 5. Ці конструкції одержували шляхом зв'язування 2-3 копій V_HH за допомогою гліцин-серинового лінкера з подальшим безпосереднім синтезом цієї пов'язаної послідовності в комбінації з послідовністю нуклеїнової кислоти сигнального пептиду Kozak-CD8α, і клонуванням в каркас PLLV-hEF1α-81373 CAR за допомогою ділянок рестрикції EcoRI і SpeI. Як контролі, одну копію V_HH також клонували в один і той же каркас PLLV-hEF1α-81373 CAR за допомогою аналогічних способів (GSI5011 і GSI5012, перераховані в Таблиці 4).

Лентівірусні вектори, що несуть гени CAR GSI5001-GSI5017, упаковували і титрували згідно з протоколами, як описано в Прикладі 2. Застосовуючи протоколи, описані в Прикладі 2, МКПК людини одержували з периферичної крові добровольців для подальшого виділення первинних Т-клітин людини за допомогою наборів для виділення Т-клітин людини Miltenyi Pan (Miltenyi human PanT cell isolation kit). Очищені Т-клітини попередньо активували і розмножували із застосуванням мікрогранул анти-CD3/CD28 Miltenyi, як описано в Прикладі 2. Після цього попередньо активовані Т-клітини трансдукували лентівірусним матеріалом в присутності 7 мкг/мл полібрену шляхом центрифугування при 1200 g, 32 °C протягом 1,5 год. Трансдуковані клітини потім переносили в інкубатор для клітинної культури з метою експресії трансгену в придатних умовах.

На день 3 після трансдукції трансдуковані Т-клітини збирали і спільно інкубували з пухлинними клітинами протягом 20 годин при співвідношенні ефекторних клітин (CAR-T) і

клітин-мішеней 20:1. Для аналізу цитотоксичності CAR-T, спрямованої на пухлинні клітини, реагенти для аналізу люмінесценції люциферази One-glo (Promega # E6110) додавали до спільно культивованих клітин і вимірювали специфічну цитотоксичність для кожного CAR-T, як описано в Прикладі 2.

5 Число копій інтегрованих генів CAR для кожної групи визначали за допомогою напівкількісного методу ПЛР (кільк.-ПЛР). Якщо коротко, геномні ДНК з кожної групи CAR-T одержували за допомогою набору Gentra Puregene Cell Kit (Qiagen). Концентрацію геномної ДНК визначали за допомогою Nanodrop, а зразок 10 нг геномної ДНК для стандартизованого аналізу методом кільк.-ПЛР обробляли SYBR Green Realtime PCR Master mix plus (Toyobo) на пристрої 10 q-PCR ABI # 7300 із застосуванням специфічних праймерів CAR (прямий праймер 137P2F (SEQ ID NO: 252): 5'-GTCCTTCTCCTGTCACTGGTTAT-3'; і зворотній праймер 137P2R (SEQ ID NO: 253): 5'-TCTTCTTCTTCTGGAAATCGGCA-3'). Відносна кількість копій кожного інтегрованого гену CAR вираховували на основі стандартної кривої, одержаної за допомогою плазмиди, що містить цільові послідовності.

15 В Таблиці 7 нижче вказані кількості копій кожного препарату CAR-T, при цьому дані припускали інтеграцію високоцільового гену в геном Т-клітин.

Таблиця 7.

Кількість копій інтегрованого геному

CAR T-клітини з конструкціями	Копії/нг гДНК
GSI5001	18257060
GSI5002	15105810
GSI5003	17307510
GSI5004	2735165
GSI5005	Не оброблено
GSI5006	6692277
GSI5007	6929693
GSI5008	15549250
GSI5009	10602720
GSI5010	7353348
GSI5011	3089537
GSI5012	650551. 3
GSS005	1070972
GSI005	321521
UnT	72,77
вода	117

20 Як проілюстровано на ФІГ. 3А-3В, моноспецифічний V_HH CAR проти BCMA (GSI5011) і моноспецифічний V_HH CAR проти CD38 (GSI5012) продемонстрували сильну цитотоксичність, спрямовану на лінію клітин множинної мієломи RPMI8226.Luc. У випадку з GSI5011 CAR, лізувалися 42,98±2,86 % клітин PMI8226.Luc, а у випадку з GSI5012, лізувалися 61,25±1,92 % клітин RPMI8226.Luc, в порівнянні з неспецифічним лізисом, зумовленим нетрансдукованими контрольними Т-клітинами (UnT, 9,25±1,11 %).

25 Біспецифічні CAR GSI5001-GSI5010 зумовлювали потужний специфічний лізис лінії клітин множинної мієломи RPMI8226.Luc в порівнянні з нетрансдукованими контрольними Т-клітинами (UnT). Як ілюстровано на ФІГ. 3А і 3В, відсоток специфічного лізису клітин RPMI8226.Luc становив 98,91±0,17 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5001, 97,10±0,26 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5002, 93,85±0,69 % для CAR-T клітин, що експресують GSI5003, 82,81±2,40 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5004, 98,95±0,66 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5005, 93,91±1,25 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5006, 96,49±1,05 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5007, 94,41±0,75 % для CAR-T-клітин, що експресують SI5008, 90,72±0,62 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5009, і 85,05±2,69 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5010, в порівнянні з неспецифічним лізисом, зумовленим 35 нетрансдукованими контрольними Т-клітинами (UnT, 9,25±1,11 %). Ці результати також свідчили про те, що більш короткий лінкер Gly-Ser, напевно, демонструє більш високий ступінь цитотоксичності, спрямований на пухлинні клітини-мішені. Для вивчення таких ефектів в умовах субоптимального аналізу можна проводити додаткові дослідження. Більш того, порядок анти-BCMA V_HH і анти-CD38 V_HH у векторі не чинив суттєвого впливу на кінцевий ступінь

цитотоксичності в клітинах RPMI8226.Luc. В аналізі також готували дві CAR-T-клітини на основі scFv, в яких GSS005 був анти-BCMA CAR на основі scFv, а GSI006 був анти-CD38 CAR на основі scFv. Як GSS005, так і GSI005 продемонстрували сильний специфічний лізис, спрямований на клітини RPMI8226.Luc ($57,94 \pm 1,91$ % для GSS005; $61,25 \pm 1,92$ % для GSI005).

Були підготовлені сконструйовані Т-клітини з моновалентним CAR, специфічним до BCMA (GSI5011), двовалентним CAR, специфічним до BCMA (GSI5012), або тривалентним CAR, специфічним до BCMA (GSI5013), і сконструйовані Т-клітини з моновалентним CAR, специфічним до CD38 (GSI5012), двовалентним CAR, специфічним до CD38 (GSI5016) або тривалентним CAR, специфічним до CD38 (GSI5017), при цьому аналізи цитотоксичності проводили на клітинах RPMI8226.Luc, як описано вище. Як проілюстровано на ФІГ. 4, відсоток специфічного лізису клітин RPMI8226.Luc становив $63,25 \pm 2,64$ % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5011, $61,04 \pm 2,75$ % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5014, і $59,57 \pm 2,64$ % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5015, в порівнянні з неспецифічним лізисом ($0,05$ % $\pm$ $2,33$ %), зумовленим нетрансдукованими контрольними Т-клітинами (UnT). Також, як проілюстровано на ФІГ. 4, відсоток специфічного лізису клітин RPMI8226.Luc, зумовленого анти-CD38 V_HH CAR-T, становив $95,79 \pm 0,62$ % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5012, $94,16 \pm 0,31$ % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5016, і $97,61 \pm 0,77$ % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5015, в порівнянні з неспецифічним лізисом ($57,92$ % $\pm$ $2,88$ %), зумовленим нетрансдукованими контрольними Т-клітинами (UnT). Наведені дані свідчать про те, що ці CAR з різними антигензв'язуючими модальностями мають сильну протипухлинну активність, спрямовану на BCMA-позитивні клітини.

Приклад 4. Одержання, аналізи *in vitro* і *in vivo* типового CD19 × CD20 CAR

Типові анти-CD19 sdAb і анти-CD20 sdAb одержували за допомогою аналогічних процедур, описаних в Прикладі 1. Ці однодомні антитіла наведені в Таблиці 2. Моноспецифічний CD19 CAR на основі CD19 V_HH і моноспецифічний CD20 CAR на основі CD20 V_HH одержували, як описано в Прикладі 2, і наведений в Таблиці 4. Типовий біспецифічний CD19 × CD20 CAR на основі CD19 V_HH і CD20 V_HH сконструювали, як описано в Прикладі 3, і наведений в Таблиці 6. Каркашний вектор CAR, застосовуваний для побудови типового CD19 CAR, CD20 CAR і CD19 × CD20 CAR, кодує від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8α, шарнірний будинок n CD8α, трансмембранний домен CD28, цитоплазматичний домен CD28 і цитоплазматичний домен CD3ζ. На ФІГ. 5 проілюстровані конструкції CD19 CAR, CD20 CAR і біспецифічного CD19 × CD20 CAR. Сконструйовані CAR-T-клітини, які експресують CD19 CAR, CD20 CAR або біспецифічний CD19 × CD20 CAR, одержували, як описано в Прикладі 2.

Цитотоксичність CAR-T-клітин визначали в 4-годинному аналізі спільного культивування. В експериментах, підготовлені CAR-T-клітини центрифугували, потім розбавляли до бажаних концентрацій DPBS з 10 % сироваткою AB людини і культивували на 96-лункових планшетах. Пухлинні клітини Раджі (Raji), які, як відомо, виявляють сильну експресію CD19 і CD20, позначали Calcein-AM (BD Biosciences). Мічені CAR-T-клітини і клітини Раджі культивували протягом 4 годин при 37 °C при співвідношенні ефektorних клітин і клітин-мішеней 10:1. Згодом цитотоксичність CAR-T-клітин визначали за допомогою FACS.

Як проілюстровано на ФІГ. 6, верхня ліва панель, нетрансдуковані Т-клітини не зумовлювали значимого лізису клітин Раджі. Цитотоксичність в клітинах Раджі становила приблизно 40 % і зумовлювалася або CD19- (39 %, верхня права панель), або CD20- (41 %, нижня ліва панель) моноспецифічними V_HH CAR-T-клітинами. Коли ті ж самі CD19 V_HH і CD20 V_HH з'єднували для одержання домену, який функціонував як позаклітинний антигензв'язуючий домен в тій же конструкції, тобто, в CD19xCD20 біспецифічних CAR-T-клітинах, цитотоксичність в пухлинних клітинах Раджі (75,24 %) підвищувалася в порівнянні з моноспецифічними CD19 V_HH CAR-T або CD20 V_HH CAR-T-клітинами (ФІГ. 6, нижня права панель).

Дослідження моделей пухлини миші

Мишам лінії NOG вводили 4×10^6 клітин Раджі на мишу шляхом ін'єкції в хвостову вену. Через 10 днів мишей випадковим чином розділяли на чотири рівні групи, при цьому кожній групі вводили еквівалентні дози нетрансдукованих Т-клітин, CD19 CAR-T-клітин, CD20 CAR-T-клітин, або CD19xCD20 біспецифічних CAR-T-клітин, відповідно, і спостерігали безперервно протягом 5 тижнів.

Як проілюстровано на ФІГ. 7, одержані дані виживання *in vivo* давали підставу припустити, що показник загальної виживаності для мишей, які отримували CD19xCD20 біспецифічні CAR, був вище, ніж у мишей, які отримували CD19- або CD20- моноспецифічні CAR-T-клітини.

Приклад 5. Одержання типових моноспецифічних двовалентних CAR, що мають два різних домени, що зв'язують BCMA

Потенційно активні клони V_HH, як описано в Прикладі 2, також можна застосовувати для одержання моноспецифічних, полівалентних CAR, що володіють двома або більшою кількістю різних доменів, що зв'язуються з мішенню, у позаклітинному антигензв'язуючому домені. Два репрезентативних клони анти-BCMA sdAb (клон 269A37353 і клон 269A37917) були відібрані для побудови різних типових моноспецифічних двовалентних конструкцій CAR, описаних в даному прикладі.

Двовалентні CAR, націлені на BCMA (тобто, двовалентні BCMA CAR), можна згенерувати шляхом злиття двох різних BCMA-специфічних доменів V_HH за допомогою придатного пептидного лінкера (наприклад, полімеру Gly-Ser), з подальшою вставкою зливої конструкції в каркасний вектор сигнального домену CAR. Типові двовалентні конструкції BCMA CAR (GSI5021-GSI5026), що мають два різних домени 269A37353 і 269A37917, що зв'язуються з BCMA, наведені в Таблиці 5. У різних конструкціях застосовували пептидні лінкери різної довжини. Кожна з конструкцій GSI5021-GSI5023 кодувала від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8α, 269A37353, пептидний лінкер, 269A37917, шарнір CD8α, трансмембранний домен CD8α і цитоплазматичний домен людини CD3ζ. Кожна з конструкцій GSI5024-GSI5026 кодувала від N-кінця до C-кінця: сигнальний пептид CD8α, 269A37917, пептидний лінкер, 269A37353, шарнір CD8α, трансмембранний домен CD8α, цитоплазматичний домен CD137 і цитоплазматичний домен людини CD3ζ. Кожну конструкцію додатково зливали з послідовністю Kozak на 5' кінці з метою одержання повної кодуючої послідовності. Повну кодуючу послідовність безпосередньо синтезували і клонували в каркас PLLV-hEF1α-81373 CAR за допомогою ділянок рестрикції EcoRI і SpeI згідно з загальноприйнятими протоколами молекулярного клонування, відомими в даній галузі техніки. Навпаки, моноспецифічні, моновалентні CAR (GSI5019 і GSI5020, перераховані в Таблиці 4), що мають один і той же каркас сигнального домену CAR, конструювали за допомогою аналогічних методів.

Лентівірусні вектори, що несуть кожну конструкцію CAR GSI5019-GSI5026, упаковували і титрували згідно з протоколами, як описано в Прикладі 2. Застосовуючи протоколи, описані в Прикладі 2, МКПК людини одержували із зразків периферичної крові добровольців для подальшого виділення первинних Т-клітин людини за допомогою наборів для виділення Т-клітин людини Miltenyi Pan (Miltenyi human PanT cell isolation kit). Очищені Т-клітини попередньо активували і розмножували із застосуванням мікрогранул анти-CD3/CD28 Miltenyi, як описано в Прикладі 2.

Після цього попередньо активовані Т-клітини трансдукували лентівірусним матеріалом в присутності 7 мкг/мл полібрену шляхом центрифугування при 1200 г, 32 °C протягом 1,5 год. Трансдуковані клітини потім переносили в інкубатор для клітинної культури з метою експресії трансгену в придатних умовах.

На день 3 після трансдукції трансдуковані Т-клітини збирали і спільно інкубували з пухлинними клітинами (клітини RPMI8226.Luc або клітини U87MG.Luc) протягом 20 годин при співвідношенні ефекторних клітин (CAR-T) і клітин-мішеней 20:1. Клітини RPMI8226.Luc є клітинами множинної мієломи, які експресують люциферазу, і є BCMA-позитивними. Клітини U87MG.Luc є клітинами гліобластоми, які експресують люциферазу, і є BCMA-негативними. Для аналізу цитотоксичності CAR-T, спрямованої на пухлинні клітини, реагенти для аналізу люмінесценції люциферази One-glo (Promega # E6110) додавали до спільно культивованих клітин і вимірювали специфічну цитотоксичність для кожного CAR-T, як описано в Прикладі 2.

Як проілюстровано на ФІГ. 8А, відсоток специфічного лізису клітин RPMI8226.Luc становив 88,21±1,29 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5019, 93,84±1,13 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5020, 71,45±1,79 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5021, 99,80±0,45 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5022, 97,46±0,50 % для CAR-T-клітин, експресують хGSI5023, 81,29±1,27 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5024, 93,50±0,47 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5025, 87,83±0,23 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5026, відповідно, в порівнянні з нетрансдукованими контрольними Т-клітинами – 13,49 % ± 1,75 % (UnT). Також, як проілюстровано на ФІГ. 8В, відсоток специфічного лізису BCMA-негативної лінії клітин U87MG.Luc склав 2,84±7,41 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5019, 15,50±2,24 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5020, 6,74±3,37 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5021, 8,03±2,36 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5022, 9,00±1,88 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5023, 17,03±2,27 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5024, 16,81±1,98 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5025, -11,55±5,43 % для CAR-T-клітин, що експресують GSI5026, в порівнянні з нетрансдукованими контрольними Т-клітинами – 12,49 % ± 3,79 % (UnT). Наведені дані свідчать про те, що полівалентні CAR з різними антигензв'язуючими модальностями мають сильну протипухлинну активність, спрямовану на BCMA-позитивні клітини, але не на BCMA-негативні клітини.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Однодоменне антитіло (sdAb), спрямоване проти В-клітинного антигену дозрівання (BCMA),
5 що містить області, які визначають комплементарність (CDR) 1, CDR2 і CDR3, де CDR1 містить SEQ ID NO: 16, CDR2 містить SEQ ID NO: 27, і CDR3 містить SEQ ID NO: 38.
2. Антитіло анти-BCMA, або його антигензв'язуючий фрагмент, що містить анти-BCMA sdAb за п. 1.
3. Химерний рецептор антигенів (CAR), який містить:
10 (a) позаклітинний антигензв'язуючий домен, що містить анти-BCMA sdAb за п. 1;
(b) трансмембранний домен; та
(c) внутрішньоклітинний сигнальний домен.
4. CAR за п. 3, який **відрізняється** тим, що трансмембранний домен є похідним від CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 або білка програмованої клітинної смерті 1 (PD1).
- 15 5. CAR за п. 4, який **відрізняється** тим, що трансмембранний домен є похідним від CD8 α або CD28.
6. CAR за будь-яким із пп. 3-5, який **відрізняється** тим, що внутрішньоклітинний сигнальний домен містить первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен імунної ефektorної клітини.
7. CAR за п. 6, який **відрізняється** тим, що первинний внутрішньоклітинний сигнальний домен є похідним від CD3 ζ .
- 20 8. CAR за будь-яким із пп. 3-7, який **відрізняється** тим, що внутрішньоклітинний сигнальний домен містить співстимулюючий сигнальний домен.
9. CAR за п. 8, який **відрізняється** тим, що співстимулюючий сигнальний домен є похідним від співстимулюючої молекули, вибраної із CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, асоційованого з функцією лімфоцитів антигену 1 (LFA-1), індукованого Т-клітинного співстимулятора (ICOS), CD2, CD7, LIGHT, групи природних клітин-кілерів 2C (NKG2C), B7-H3, CD83 або будь-якої їх комбінації.
- 25 10. CAR за п. 9, який **відрізняється** тим, що співстимулюючий сигнальний домен містить цитоплазматичний домен CD28 і/або цитоплазматичний домен CD137.
11. CAR за будь-яким із пп. 3-10, який додатково містить шарнірний домен, розташований між С-кінцем позаклітинного антигензв'язуючого домену та N-кінцем трансмембранного домену.
12. CAR за п. 11, який **відрізняється** тим, що шарнірний домен є похідним від CD8 α .
13. CAR за будь-яким із пп. 3-12, який додатково містить сигнальний пептид, розташований на N-кінці поліпептиду.
- 35 14. CAR за п. 13, який **відрізняється** тим, що сигнальний пептид є похідним від CD8 α .
15. CAR за будь-яким із пп. 3-14, який **відрізняється** тим, що CAR є моновалентним.
16. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що кодує анти-BCMA sdAb за п. 1.
17. Вектор, що містить виділену молекулу нуклеїнової кислоти за п. 16.
18. Сконструйована імунна ефektorна клітина, що містить виділену молекулу нуклеїнової
40 кислоти за п. 16 або вектор за п. 17.
19. Фармацевтична композиція, що містить sdAb за п. 1 та фармацевтично прийнятний носій.
20. Фармацевтична композиція за п. 19 для застосування в способі лікування множинної мієломи.
21. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло анти-BCMA або його антигензв'язуючий фрагмент за п. 2.
- 45 22. Вектор, що містить виділену молекулу нуклеїнової кислоти за п. 21.
23. Сконструйована імунна ефektorна клітина, що містить виділену молекулу нуклеїнової кислоти за п. 21 або вектор за п. 22.
24. Фармацевтична композиція, що містить антитіло анти-BCMA або його антигензв'язуючий
50 фрагмент за п. 2 та фармацевтично прийнятний носій.
25. Фармацевтична композиція за п. 24 для застосування в способі лікування множинної мієломи.
26. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що кодує CAR за будь-яким із пп. 3-15.
27. Вектор, що містить виділену молекулу нуклеїнової кислоти за п. 26.
- 55 28. Сконструйована імунна ефektorна клітина, що містить виділену молекулу нуклеїнової кислоти за п. 26 або вектор за п. 27.
29. Фармацевтична композиція, що містить CAR за будь-яким із пп. 3-15 та фармацевтично прийнятний носій.
30. Фармацевтична композиція за п. 29 для застосування в способі лікування множинної
60 мієломи.

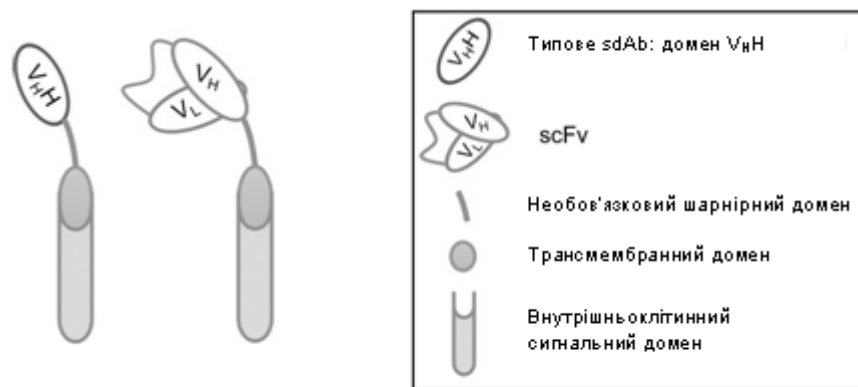


Fig. 1A

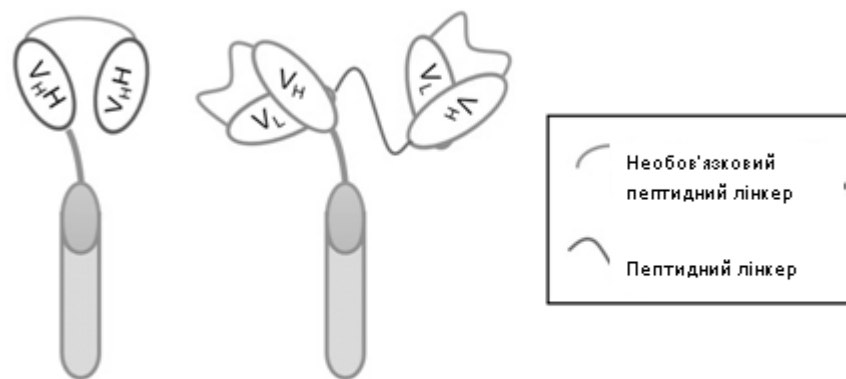
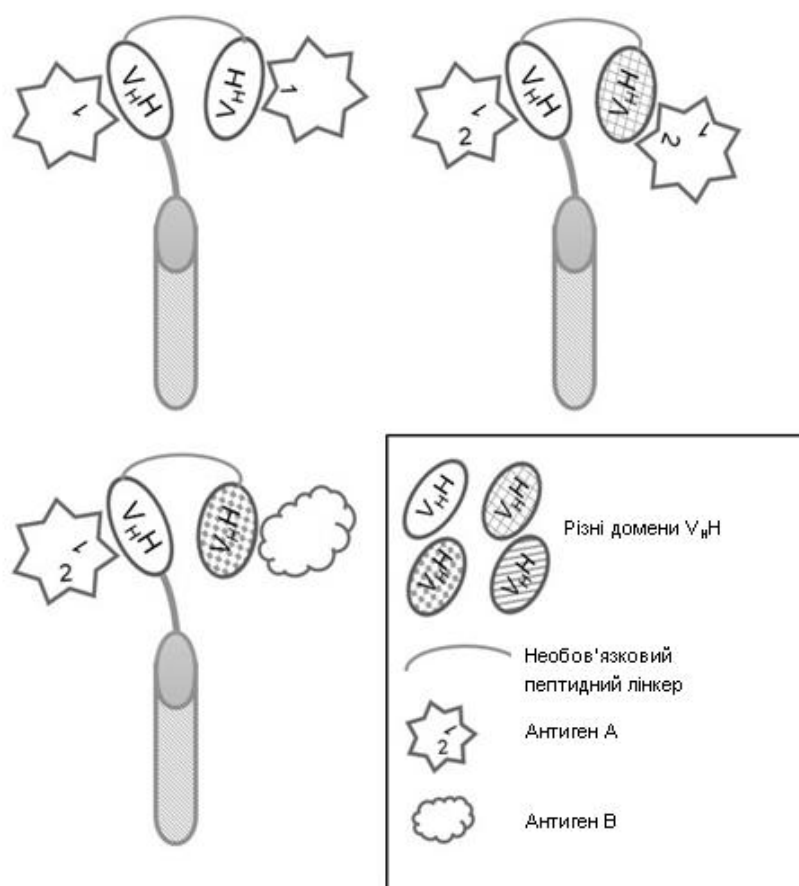
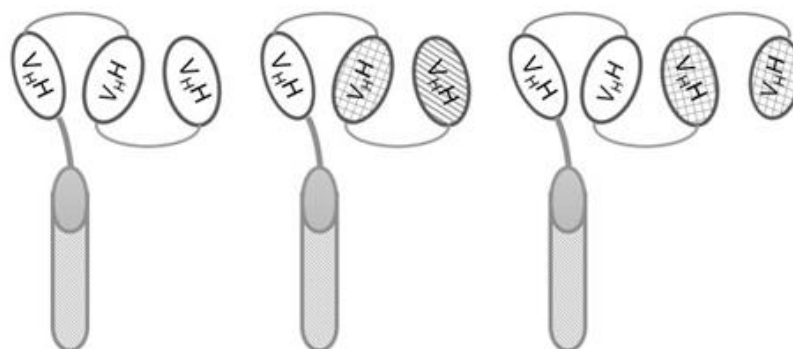


Fig. 1B



Фиг. 1С



Фиг. 1D

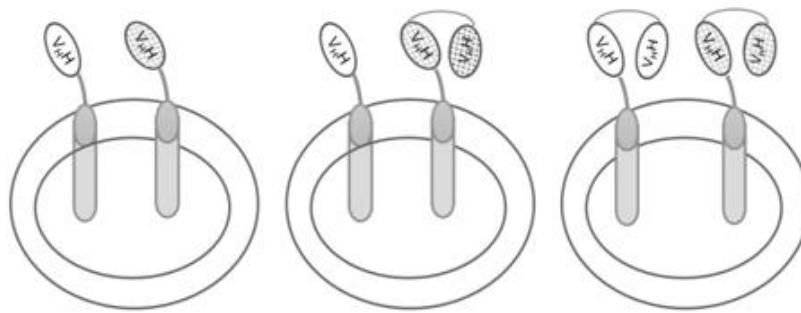


Fig. 1E

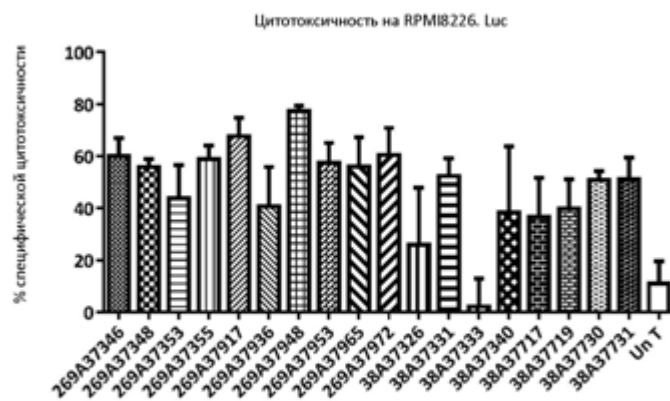
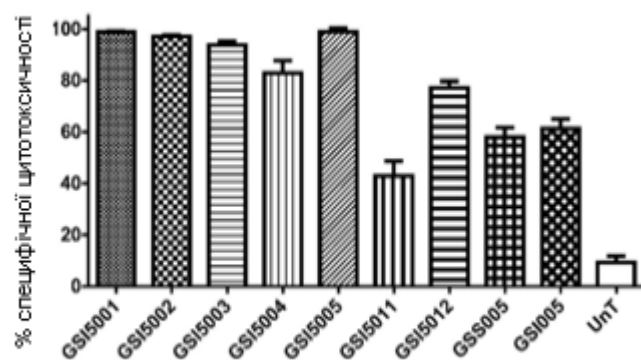


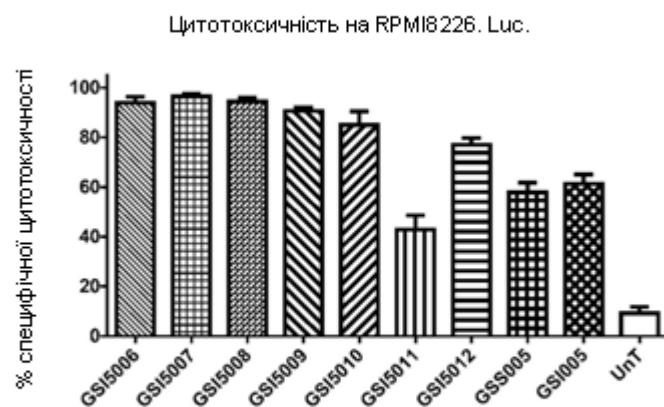
Fig. 2A



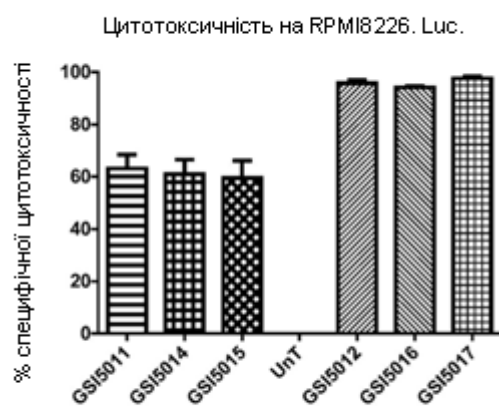
Фіг. 2В



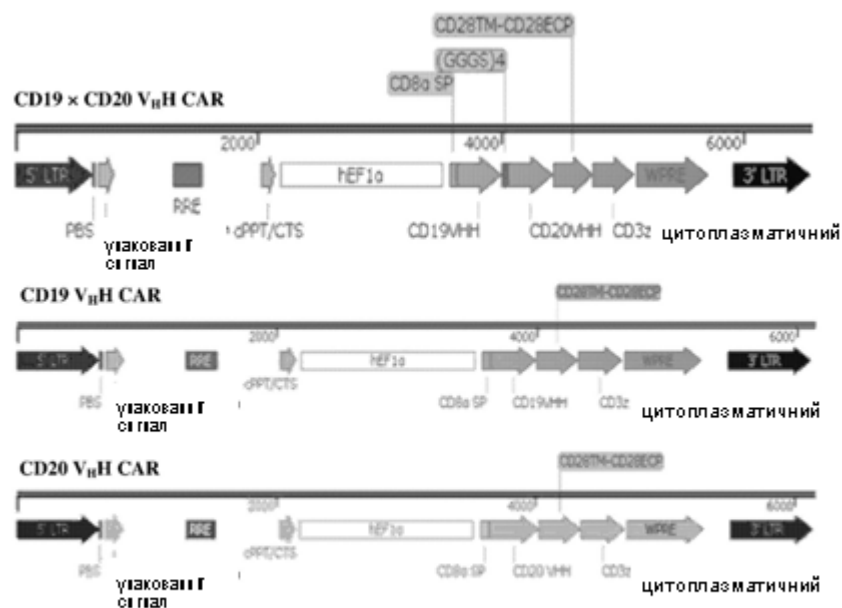
Фіг. 3А



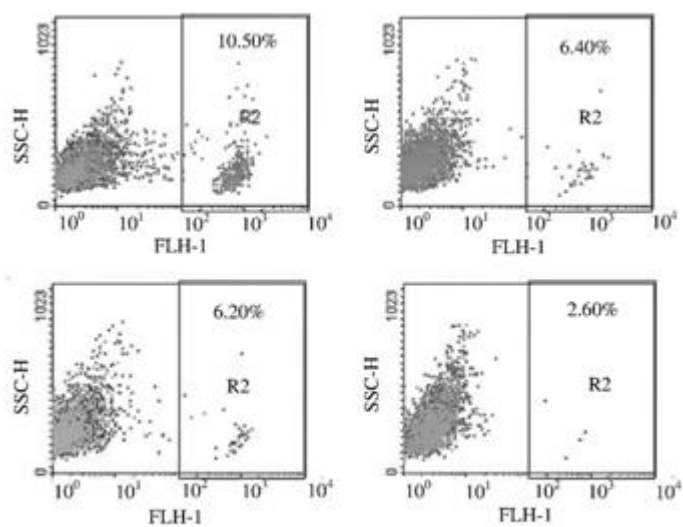
Фіг. 3В



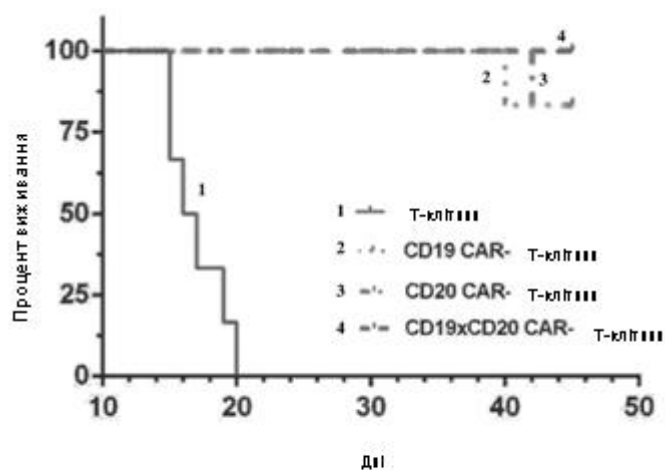
Фіг. 4



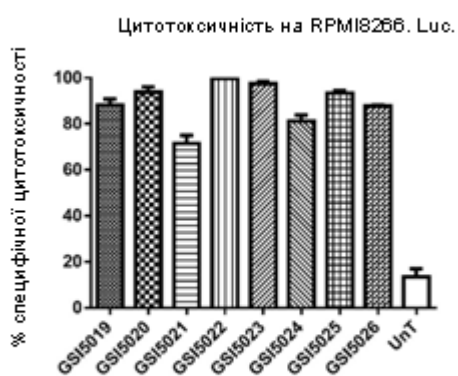
Фиг. 5



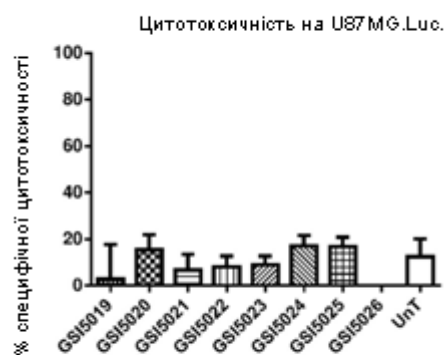
Фиг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8A



Фіг. 8B

