



MD/EP 3823665 T2 2024.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3823665 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 39/00 (2006.01.01)
A61K 35/17 (2015.01.01)
A61P 35/02 (2006.01.01)
C07K 14/725 (2006.01.01)
C07K 16/28 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

<p>(21) Numărul de depozit: e 2021 0484</p> <p>(22) Data de depozit: 2019.07.18</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 19749097.2, 2019.07.18</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3823665, 2021.05.26</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 201862700615 P</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2018.07.19</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: US</p>	<p>(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 05/2024, 2024.05.31</p> <p>(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 04/2024, 2024.01.24</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 06/2021, 2021.06.30</p>
<p>(71) Solicitant: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US</p> <p>(72) Inventatori: DILILLO David, US; DELFINO Frank, US; BRAY Kevin, US; MEAGHER Thomas Craig, US; KIRSHNER Jessica, US; SINESHCHEKOVA Olga, US</p> <p>(73) Titular: REGENERON PHARMACEUTICALS INC., US</p> <p>(74) Mandatar autorizat: LAZICOV Tatiana</p>	

(54) Receptori antigeni chimerici cu specificitate BCMA și utilizările acestora

(57) Rezumat:

1

Antigenul de maturare a celulelor B (BCMA) este exprimat pe plasmocitele maligne. Prezenta invenție se referă la receptori de antigeni chimerici specifici pentru BCMA și la celule, care exprimă astfel de receptori de antigeni chimerici. În anumite variante de realizare celulele construite, care exprimă receptori de antigeni chimerici, conform prezentei invenții, sunt capabile să

2

inhibe creșterea tumorilor, care exprimă BCMA.

Celulele modificate, conform invenției, sunt utile pentru tratamentul bolilor și tulburărilor în care creșterea sau inducerea de BCMA a unui răspuns imun țintit este dezirabilă și/sau terapeutic benefică. De exemplu, celulele modificate, care exprimă receptori de antigeni chimerici specifici pentru BCMA, conform invenției, sunt utile pentru

MD/EP 3823665 T2 2024.05.31

tratamentul diferitor tipuri de cancer, inclusiv al mielomului multiplu.

Revendicări: 15

Figuri: 1

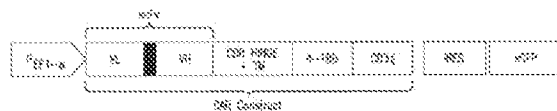


FIG. 1

(54) Chimeric antigen receptors with BCMA specificity and uses thereof

(57) Abstract:

1

B-cell maturation antigen (BCMA) is expressed on malignant plasma cells. The present invention provides BCMA-specific chimeric antigen receptors and cells expressing such chimeric antigen receptors. In certain embodiments, engineered cells expressing the chimeric antigen receptors of the present invention are capable of inhibiting the growth of tumors expressing BCMA. The engineered cells of the invention are useful for the treatment of diseases and disorders in which an

2

upregulated or induced BCMA-targeted immune response is desired and/or therapeutically beneficial. For example, engineered cells expressing the BCMA-specific chimeric antigen receptors of the invention are useful for the treatment of various cancers, including multiple myeloma.

Claims: 15

Fig.: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL INVENTIEI**

5 Prezenta invenție se referă la receptorii de antigen himeric (CAR) și la celule modificate cuprinzând astfel de CAR, care sunt specifice pentru antigenul de maturare a celulelor B (BCMA) și la metodele de utilizare ale acestora.

STADIUL TEHNICII

10 Antigenul de maturare a celulelor B (BCMA), cunoscut și sub numele de TNFRSF17 sau CD269, este o proteină transmembranară de tip III, lipsită de o peptidă semnal și care conține un domeniu extracelular bogat în cisteină BCMA, împreună cu proteinele strâns înrudite, promovează supraviețuirea celulelor B în stadii distincte de dezvoltare. BCMA este exprimat exclusiv în celulele din linia celulelor B, în special în regiunea interfoliculară a centrului germinal, precum și pe plasmoblaste și celule plasmatiche diferențiate. BCMA este indus selectiv în timpul diferențierii celulelor plasmatiche și este
15 necesar pentru supraviețuirea optimă a celulelor plasmatiche cu viață lungă din măduva osoasă. În mielomul multiplu, BCMA este exprimat pe scară largă pe celulele plasmatiche maligne la niveluri ridicate, iar expresia BCMA este crescută odată cu progresia de la celule normale la mielom multiplu activ. BCMA este, de asemenea, exprimat în alte afecțiuni maligne ale celulelor B, inclusiv macroglobulinemia Waldenstrom, limfomul Burkitt și celulele B difuze mari Limfom. Tai și colab.,
20 *Immunotherapy*, 7(11): 1187-1199, 2015.

Imunoterapia adoptivă, care implică transferul de celule T autologe specifice antigenului generate ex vivo, este o strategie promițătoare pentru tratarea infecțiilor virale și a cancerului. Celulele T utilizate pentru imunoterapia adoptivă pot fi generate fie prin extinderea celulelor T specifice antigenului, fie prin redirectionarea celulelor T prin inginerie genetică.

25 Noi specificități în celulele T au fost generate cu succes prin transferul genetic al receptorilor de celule T transgenici sau al receptorilor de antigen himeric (CAR) (Jena, Dotti et al. 2010). CAR-urile sunt receptori sintetici constând dintr-o porțiune de țintire care este asociată cu unul sau mai multe domenii de semnalizare într-o singură moleculă de fuziune. În general, fragmentul de legare al unui CAR constă dintr-un domeniu de legare la antigen al unui anticorp cu catenă unică (scFv), cuprinzând fragmentele
30 variabile ale lanțului ușor și greu ale unui anticorp monoclonal unite printr-un linker flexibil. Domeniile de semnalizare pentru CAR-uri de prima generație sunt derivate din regiunea citoplasmatică a lanțurilor gamma CD3zeta sau a receptorului Fc. S-a demonstrat că CAR-urile de prima generație redirectionează cu succes citotoxicitatea celulelor T. Cu toate acestea, ei nu au reușit să ofere expansiune prelungită și activitate anti-tumorală in vivo. Domeniile de semnalizare din moleculele co-stimulatoare, precum și
35 domeniile transmembranare și balama au fost adăugate pentru a forma CAR-uri de a doua și a treia generație, ceea ce duce la unele studii terapeutice de succes la oameni. De exemplu, celulele T redirectionate CAR specifice pentru antigenul CD19 de diferențiere a celulelor B au demonstrat o eficacitate dramatică în tratamentul tumorilor maligne ale celulelor B, în timp ce celulele T redirectionate TCR au arătat beneficii la pacienții care suferă de cancer solid. Stauss și alții. descrie strategii de
40 modificare a CAR și TCR terapeutice, pentru utilizare în tratamentul cancerului, de exemplu, pentru a îmbunătăți funcția efectoră specifică antigenului și a limita toxicitatea celulelor T modificate (Opinia curentă în *Pharmacology* 2015, 24:113-118).

Smith și colab., *Mol Ther.* 26(6):1447-1456, 2018 dezvăluie un vector de celule T CAR țintit BCMA derivat din fragmentul variabil uman cu un singur lanț. Harrington et al., *Blood* 130(S1):1813,
45 2017 dezvăluie JCARH125, un CAR anti-BCMA complet uman pentru utilizare în tratamentul mielomului multiplu. WO 2019/149249 descrie un receptor de antigen himeric (CAR) care se poate lega în mod specific la o proteină BCMA cuprinzând un domeniu structural de legare a BCMA, un domeniu transmembranar, un domeniu costimulator și un domeniu de semnalizare intracelular.

50 Celulele modificate care exprimă receptori de antigen himeric care țintesc BCMA ar fi utile în setările terapeutice în care se dorește țintirea specifică și uciderea mediată de celulele T a celulelor care exprimă BCMA.

SCURT REZUMAT AL INVENȚIEI

55 Prezenta invenție furnizează receptori de antigen himeric specifici pentru antigenul de maturare a celulelor B (BCMA) așa cum sunt definiți în revendicări, acizi nucleici care codifică CAR, vectori care cuprind acizii nucleici și celulele cuprinzând acizii nucleici sau vectori. Invenția furnizează, de asemenea, celule proiectate cuprinzând CAR-uri și metode de obținere a celulelor proiectate. Invenția furnizează în plus compoziții farmaceutice cuprinzând celule T modificate genetic cuprinzând CAR-urile sau

cuprinzând celulele proiectate. Invenția furnizează, de asemenea, celulele proiectate pentru utilizare în tratamentul cancerului care exprimă BCMA.

REZUMATUL ÎNVĂȚĂTURILOR TEHNICE

Invenția este definită în revendicări. Orice aspecte, exemple de realizare și exemple ale prezentei dezvoltării care nu intră în sfera revendicărilor anexate nu fac parte din invenție și sunt furnizate doar pentru informare.

Într-un aspect, prezenta invenție furnizează un receptor de antigen himeric specific pentru antigenul de maturare a celulelor B (BCMA) care cuprinde, de la capătul N-terminal la capătul C-terminal: (a) un domeniu de legare a ligandului extracelular care cuprinde un domeniu de legare a antigenului anti-BCMA; (b) o balama; (c) un domeniul transmembranar; și (d) un domeniu citoplasmatic care cuprinde un domeniu costimulator și un domeniu de semnalizare. În invenție, domeniul de legare a ligandului extracelular cuprinde un domeniu de fragment variabil de lanț unic anti-BCMA (scFv) care cuprinde o regiune variabilă de lanț ușor (LCVR) și o regiune variabilă de lanț greu (HCVR). Domeniul scFv anti-BCMA cuprinde un linker între LCVR și HCVR. În unele cazuri, receptorul antigen himeric cuprinde în plus un linker între domeniul de legare a ligandului extracelular (de exemplu, domeniul scFv) și balama. În unele cazuri, linkerul cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 93-96. În unele exemple de realizare, linkerul este un linker (G4S)_n, în care n este 1-10.

În invenție, balama și domeniul transmembranar sunt din CD8. În unele cazuri, balama, domeniul transmembranar sau ambele sunt de la o polipeptidă CD8 α . În invenție, domeniul costimulator cuprinde un domeniu costimulator 4-1 BB. În invenție, domeniul de semnalizare cuprinde un domeniu de semnalizare CD3zeta. În unele exemple de realizare, balama cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 97. În unele exemple de realizare, domeniul transmembranar cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 98. În unele realizări, domeniul costimulator 4-1 BB cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 99. În unele realizări, domeniul de semnalizare CD3zeta cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 100.

În unele aspecte ale dezvoltării, LCVR cuprinde regiunile de determinare a complementarității (CDR) ale unui LCVR cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 10, 26, 42, 58 și 74. În unele aspecte, LCVR cuprinde domenii LCDR1-LCDR2-LCDR3 cuprinzând secvențele de aminoacizi, respectiv, ale SECV ID NR: 12-14-16, 28-30-32, 44-46-48, 60-62-64, sau 76-78-80. În unele aspecte, HCVR cuprinde CDR-urile unui HCVR cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 2, 18, 34, 50 și 66. În unele aspecte, HCVR cuprinde domenii HCDR1-HCDR2-HCDR3 cuprinzând secvențele de aminoacizi, respectiv, ale SECV ID NR: 4-6-8, 20-22-24, 36-38-40, 52-54-56, sau 68-70-72. În invenție, LCVR cuprinde domenii LCDR1-LCDR2-LCDR3 stabilite în SECV ID NR: 60-62-64 respectiv și HCVR cuprinde domenii HCDR1-HCDR2-HCDR3 stabilite în SECV ID NR: 52-54-56 respectiv.

În unele cazuri, LCVR cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 10, 26, 42, 58 și 74, sau o secvență de aminoacizi având identitate de secvență de 95%-99% cu o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 10, 26, 42, 58 și 74; și HCVR cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 2, 18, 34, 50 și 66, sau o secvență de aminoacizi având identitate de secvență de 95%-99% cu o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 2, 18, 34, 50 și 66. În unele cazuri, LCVR cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 10, 26, 42, 58 și 74, iar HCVR cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 2, 18, 34, 50 și 66.

În unele realizări, domeniul scFv cuprinde o pereche de secvențe de aminoacizi LCVR/HCVR care cuprinde secvențele de aminoacizi ale SECV ID NR: 10/2, 26/18, 42/34, 58/50 sau 74/66. În unele cazuri, LCVR și HCVR sunt unite printr-un linker, opțional un linker (G4S)_n în care n=1-3.

În unele aspecte ale dezvoltării, receptorul antigen himeric cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 84, SECV ID NR: 86, SECV ID NR: 88 sau SECV ID NR: 90. În unele aspecte ale dezvoltării, receptorul antigen himeric cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 82. În unele aspecte ale dezvoltării, receptorul antigen himeric cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 84. În unele aspecte ale dezvoltării, receptorul antigen himeric cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 86. În invenție, receptorul antigen himeric cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 88. În unele aspecte ale dezvoltării, receptorul antigen himeric cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 90.

Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o moleculă izolată de acid nucleic care codifică un receptor de antigen himeric discutat mai sus sau aici. În unele cazuri, molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de nucleotide selectată din grupul constând din SECV ID NR: 81, 83, 85, 87 și 89. În invenție, molecula acidului nucleic poate cuprinde o secvență de nucleotidă SECV ID NR: 87.

Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează un vector care cuprinde o moleculă de acid nucleic discutată mai sus sau aici. În unele cazuri, vectorul este un vector ADN, un vector ARN, o plasmidă, un vector lentivirus, un vector adenovirus sau un vector retroviral. În unele variante de realizare, vectorul este un vector lentivirus.

5 Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o celulă care cuprinde o moleculă de acid nucleic sau un vector discutat mai sus sau aici. În unele cazuri, celula este o celulă T umană.

Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o celulă modificată cuprinzând un receptor de antigen himeric așa cum s-a discutat mai sus sau aici. În unele cazuri, celula modificată este o celulă imunitară. În unele cazuri, celula imună este o celulă efectoră imună. În unele cazuri, celula efectoră imună este un limfocit T. În unele exemple de realizare, limfocitul T este un limfocit T inflamator, un limfocit T citotoxic, un limfocit T reglator sau un limfocit T helper. În unele variante de realizare, celula modificată este un limfocit T citotoxic CD8+.

10 În unele cazuri, celulele modificate conform prezentei invenții sunt pentru utilizare în tratamentul unui cancer care exprimă BCMA. În unele cazuri, cancerul care exprimă BCMA este mielomul multiplu.

15 Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o celulă T umană modificată cuprinzând un receptor al invenției.

În unele exemple de realizare, domeniul scFv cuprinde o pereche de secvențe de aminoacizi LCVR/HCVR care cuprinde secvențe de aminoacizi din SECV ID NR:58/50. În unele cazuri, balamaua cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 97. În unele cazuri, domeniul transmembranar cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 98. În unele cazuri, domeniul costimulator 4-1BB cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 99. În unele cazuri, Domeniul de semnalizare CD3zeta cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 100.

20 În unele aspecte ale dezvoltării, celula T umană modificată cuprinde un receptor de antigen himeric care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 82. În unele aspecte ale dezvoltării, celula T umană modificată cuprinde un receptor de antigen himeric care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 84. În unele aspecte ale dezvoltării, celula T umană modificată cuprinde un receptor de antigen himeric care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 86. În unele exemple de realizare, celula T umană modificată cuprinde un receptor de antigen himeric care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 88. În unele aspecte ale dezvoltării, celula T umană modificată cuprinde un receptor de antigen himeric care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 90.

25 Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde o celulă T umană modificată genetic și un purtător acceptabil farmaceutic, în care celula T umană modificată genetic cuprinde un receptor de antigen himeric așa cum s-a discutat mai sus sau aici. În unele cazuri, compoziția farmaceutică este destinată utilizării în tratamentul unui cancer care exprimă BCMA. În unele reexemple de realizare, cancerul care exprimă BCMA este mielom multiplu.

30 Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o celulă proiectată așa cum s-a discutat mai sus sau aici. În unele cazuri, compoziția farmaceutică este destinată utilizării în tratamentul unui cancer care exprimă BCMA. În unele realizări, cancerul care exprimă BCMA este mielom multiplu.

35 Într-un alt aspect, prezenta dezvoltare furnizează utilizarea unui receptor de antigen himeric, a unei molecule de acid nucleic, a unui vector, a unei celule sau a unei celule modificate, așa cum s-a discutat mai sus sau aici, în fabricarea unui medicament pentru tratamentul cancerului care exprimă BCMA. În unele cazuri, cancerul care exprimă BCMA este mielomul multiplu. În diferite variante de realizare, receptorii de antigen himeric, moleculele de acid nucleic, vectorii, celulele sau celulele modificate descrise mai sus sau aici sunt considerate pentru utilizare în oricare dintre metodele discutate mai sus sau aici. De exemplu, în unele exemple de realizare, CAR-urile sau celulele modificate discutate aici sunt pentru utilizare în medicină sau pentru utilizare în tratamentul cancerului, așa cum s-a discutat mai sus sau aici.

40 Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o metodă de creștere a activității limfocitelor T la un subiect care cuprinde, introducerea în subiect a unui limfocit T cuprinzând un receptor de antigen himeric așa cum s-a discutat mai sus sau aici.

45 Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o metodă pentru tratarea unui subiect care suferă de cancer care cuprinde, introducerea în subiect a unei cantități eficiente terapeutică dintr-un limfocit T cuprinzând un receptor de antigen himeric așa cum s-a discutat mai sus sau aici.

50 Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o metodă pentru stimularea unui răspuns imun mediat de celule T la o populație de celule țintă sau un țesut la un subiect, cuprinzând administrarea subiectului a unei cantități eficiente dintr-o celulă modificată genetic pentru a exprima un receptor de antigen himeric așa cum s-a discutat mai sus sau aici.

55 Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o metodă pentru stimularea unui răspuns imun mediat de celule T la o populație de celule țintă sau un țesut la un subiect, cuprinzând administrarea subiectului a unei cantități eficiente dintr-o celulă modificată genetic pentru a exprima un receptor de antigen himeric așa cum s-a discutat mai sus sau aici.

Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o metodă de asigurare a imunității antitumorale la un subiect, metoda cuprinzând administrarea subiectului a unei cantități eficiente dintr-o celulă modificată genetic pentru a exprima un receptor de antigen himeric așa cum s-a discutat mai sus sau aici.

5 În unele realizări ale metodelor discutate mai sus, subiectul este un om. În unele cazuri, subiectul suferă de mielom multiplu, leucemie limfoblastică acută din linia B, leucemie limfocitară cronică cu celule B, limfom non-Hodgkin cu celule B, leucemie și limfom, leucemie limfoblastică acută, limfom Hodgkin sau leucemie acută din copilărie. În unele exemple de realizare, subiectul suferă de mielom multiplu.

10 Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o metodă de proiectare a unei populații de celule pentru a exprima un receptor de antigen himeric, în care metoda cuprinde: (a) furnizarea unei populații de celule imune; (b) introducerea în celulele imune a unei molecule de acid nucleic care codifică un receptor de antigen himeric așa cum s-a discutat mai sus sau aici; (c) cultivarea celulelor imune în condiții pentru a exprima moleculele de acid nucleic; și (d) izolarea celulelor imune care exprimă receptorul antigen himeric la suprafața celulelor. În unele cazuri, metoda mai cuprinde obținerea populației de celule imune de la un subiect înainte de introducerea moleculei de acid nucleic.

15 Într-un alt aspect, prezenta invenție se referă la receptorul antigenului himeric al invenției pentru utilizare într-o o metodă de tratare a unui cancer care exprimă BCMA la un subiect, în care metoda cuprinde: (a) realizarea unei populații de celule conform metodei discutate mai sus; și (b) reintroducerea populației de celule imune care exprimă receptorii de antigen himeric în subiect. În unele realizări, cancerul care exprimă BCMA este mielom multiplu.

Alte aspecte vor deveni evidente dintr-o revizuire a descrierii detaliate care urmează.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

25 Figura 1 ilustrează un construct de nucleotide exemplificativ pentru exprimarea unui construct de receptor de antigen himeric (CAR). Construcția nucleotidică exemplificativă cuprinde un linker VL anti-BCMA-VH scFv, o balama CD8 umană și un domeniu transmembranar, un domeniu co-stimulator 4-1 BB, un domeniu de semnalizare CD3zeta și o secvență IRES:eGFP pentru urmărirea transdusă de CAR. celule.

DESCRIERE DETALIATA

30 Din nou, invenția este definită în revendicări. Orice aspecte, exemple de realizare și exemple ale prezentei dezvoltării care nu intră în domeniul de aplicare al revendicărilor anexate nu fac parte din invenție și sunt doar furnizate numai pentru informații.

35 Dacă nu este definit altfel, toți termenii tehnici și științifici utilizați aici au aceeași semnificație pe care o înțeleg în mod obișnuit de către o persoană cu calificare obișnuită în domeniul căruia îi aparține această invenție. Așa cum este utilizat aici, termenul "aproximativ", atunci când este utilizat cu referire la o anumită valoare numerică citată, înseamnă că valoarea poate varia de la valoarea indicată cu nu mai mult de 1 %. De exemplu, așa cum este utilizată aici, expresia "aproximativ 100" include 99 și 101 și toate valorile dintre acestea (de exemplu, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

Deși orice metode și materiale similare sau echivalente cu cele descrise aici pot fi utilizate în practica sau testarea prezentei invenții, metodele și materialele preferate sunt acum descrise.

Definiții

40 Expresia „BCMA”, așa cum este utilizată aici, se referă la antigenul de maturare a celulelor B. BCMA (cunoscut și ca TNFRSF17 și CD269) este o proteină de suprafață celulară exprimată pe celulele plasmatiche maligne și joacă un rol central în reglarea maturării și diferențierii celulelor B în celule plasmatiche producătoare de imunoglobuline. Așa cum este utilizat aici, „BCMA” se referă la proteina BCMA umană, cu excepția cazului în care este specificat ca fiind dintr-o specie non-umană (de exemplu, „BCMA de șoarece”, „BCMA de maimuță” etc.). Proteina BCMA umană are secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 101.

Așa cum este utilizat aici, „un anticorp care leagă BCMA” sau un „anticorp anti-BCMA” include anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care recunosc în mod specific BCMA.

50 Termenii „domeniu de legare la ligand” și „domeniu de legare la antigen” sunt utilizați în mod interschimbabil aici și se referă la acea porțiune a unui receptor de antigen himeric sau la un anticorp corespunzător care se leagă în mod specific la un antigen predeterminat (de exemplu, BCMA). Referințele la un „anticorp corespunzător” se referă la anticorpul din care sunt derivate CDR-urile sau regiunile variabile (HCVR și LCVR) utilizate într-un receptor de antigen himeric. De exemplu, 55 structurile de receptori de antigen himeric discutate în Exemplul 2 includ scFv-uri cu regiuni variabile derivate din anticorpi anti-BCMA specifici. Acești anticorpi anti-BCMA sunt „anticorpii corespunzători” la respectivii receptori de antigen himeric.

Termenul "anticorp", așa cum este utilizat aici, înseamnă orice moleculă de legare la antigen sau complex molecular care cuprinde cel puțin o regiune de determinare a complementarității (CDR) care se

leagă în mod specific la sau interacționează cu un anumit antigen (de exemplu, BCMA). Termenul "anticorp" include molecule de imunoglobulină cuprinzând patru lanțuri polipeptidice, două lanțuri grele (H) și două lanțuri ușoare (L) interconectate prin legături disulfurice, precum și multimeri ai acestora (de exemplu, IgM). Termenul „anticorp” include, de asemenea, molecule de imunoglobulină constând din patru lanțuri polipeptidice, două lanțuri grele (H) și două lanțuri ușoare (L) interconectate prin legături disulfură. Fiecare lanț greu cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (abreviată aici ca HCVR sau VH) și o regiune constantă a lanțului greu. Regiunea constantă a lanțului greu cuprinde trei domenii, C_{H1}, C_{H2} și C_{H3}. Fiecare lanț ușor cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor (abreviată aici ca LCVR sau VL) și o regiune constantă a lanțului ușor. Regiunea constantă a lanțului ușor cuprinde un domeniu (C_{L1}). Regiunile V_H și V_L pot fi subdivizate în continuare în regiuni de hipervariabilitate, numite regiuni de determinare a complementarității (CDR), intercalate cu regiuni care sunt mai conservate, numite regiuni cadru (FR). Fiecare V_H și V_L este compus din trei CDR-uri și patru FR-uri, aranjate de la amino-terminal la carboxi-terminal în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. În diferite realizări ale invenției, FR-urile anticorpului anti-BCMA (sau porțiunea de legare a antigenului a acestuia) pot fi identice cu secvențele liniei germinale umane sau pot fi modificate în mod natural sau artificial. O secvență consens de aminoacizi poate fi definită pe baza unei analize alăturate a două sau mai multe CDR-uri.

Termenul "anticorp", așa cum este utilizat aici, include de asemenea fragmente de legare la antigen ale moleculelor de anticorp complet. Termenii „porțiune de legare la antigen” a unui anticorp, „fragment de legare la antigen” a unui anticorp și altele asemenea, așa cum sunt utilizate aici, includ orice polipeptidă sau glicoproteină care se leagă în mod specific la o polipeptidă naturală, obținută enzimatic, sintetică sau modificată genetic antigenul pentru a forma un complex. Fragmentele de legare la antigen ale unui anticorp pot fi derivate, de exemplu, din molecule de anticorp complet folosind orice tehnici standard adecvate, cum ar fi digestia proteolitică sau tehnici de inginerie genetică recombinată care implică manipularea și exprimarea ADN-ului care codifică domenii variabile și opțional constante ale anticorpului. Un astfel de ADN este cunoscut și/sau este ușor disponibil din, de exemplu, surse comerciale, biblioteci de ADN (inclusiv, de exemplu, biblioteci de anticorpi fagi) sau poate fi sintetizat. ADN-ul poate fi secvențiat și manipulat chimic sau prin utilizarea tehnicilor de biologie moleculară, de exemplu, pentru a aranja unul sau mai multe domenii variabile și/sau constante într-o configurație adecvată sau pentru a introduce codoni, a crea resturi de cisteină, a modifica, adăuga sau șterge aminoacizi, etc.

Exemple nelimitative de fragmente de legare la antigen includ: (i) fragmente Fab; (ii) fragmente F(ab')₂; (iii) fragmente Fd; (iv) fragmente Fv; (v) molecule Fv (scFv) cu catenă unică; (vi) fragmente dAb; și (vii) unități minime de recunoaștere constând din resturile de aminoacizi care imită regiunea hipervariabilă a unui anticorp (de exemplu, o regiune izolată de determinare a complementarității (CDR) cum ar fi o peptidă CDR3) sau o peptidă FR3-CDR3-FR4 constrânsă. Alte molecule modificate, cum ar fi anticorpi specifici unui domeniu, anticorpi cu un singur domeniu, anticorpi cu deleție de domeniu, anticorpi himerici, anticorpi grefați cu CDR, diacorpi, triacorpi, tetracorpi, minicorpi, nanocorpi (de exemplu, nanocorpi monovalenți, nanocorpi bivalenți etc.), mici imunofarmacaceutice modulare (SMIP) și domenii variabile IgNAR de rechin, sunt de asemenea cuprinse în expresia "fragment de legare la antigen", așa cum este utilizat aici.

Un fragment de legare la antigen al unui anticorp va cuprinde de obicei cel puțin un domeniu variabil. Domeniul variabil poate fi de orice dimensiune sau compoziție de aminoacizi și va cuprinde în general cel puțin un CDR care este adiacent sau în cadru cu una sau mai multe secvențe cadru. În fragmentele de legare la antigen care au un domeniu V_H asociat cu un domeniu V_L, domeniile V_H și V_L pot fi situate unul față de celălalt în orice aranjament adecvat. De exemplu, regiunea variabilă poate fi dimerică și conține dimeri V_H-V_H, V_H-V_L sau V_L-V_L. Alternativ, fragmentul de legare la antigen al unui anticorp poate conține un domeniu V_H sau V_L monomeric.

În anumite cazuri, un fragment de legare la antigen al unui anticorp poate conține cel puțin un domeniu variabil legat covalent la cel puțin un domeniu constant. Configurațiile exemplificative, nelimitative ale domeniilor variabile și constante care pot fi găsite într-un fragment de legare la antigen al unui anticorp din prezenta invenție includ: (i) V_H-C_{H1}; (ii) V_H-C_{H2}; (iii) V_H-C_{H3}; (iv) V_H-C_{H1}-C_{H2}; (v) V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}; (vi) V_H-C_{H2}-C_{H3}; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_{H1}; (ix) V_L-C_{H2}; (x) V_L-C_{H3}; (xi) V_L-C_{H1}-C_{H2}; (xii) V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}; (xiii) V_L-C_{H2}-C_{H3}; și (xiv) V_L-C_L. În orice configurație de domenii variabile și constante, incluzând oricare dintre configurațiile exemplificative enumerate mai sus, domeniile variabile și constante pot fi fie legate direct între ele, fie pot fi legate printr-o balama sau o regiune de legătură completă sau parțială. O regiune balama poate consta din cel puțin 2 (de exemplu, 5, 10, 15, 20, 40, 60 sau mai mulți) aminoacizi care au ca rezultat o legătură flexibilă sau semiflexibilă între domenii variabile și/sau constante adiacente într-o singură polipeptidă moleculă. Mai mult, un fragment de legare

la antigen al unui anticorp al prezentei invenții poate cuprinde un homo-dimer sau hetero-dimer (sau alt multimer) al oricăreia dintre configurațiile de domenii variabile și constante enumerate mai sus în asociere necovalentă unul cu celălalt și/ sau cu unul sau mai multe domenii V_H sau V_L monomerică (de exemplu, prin legătură(i) disulfurică).

5 În anumite variante de realizare, anticorpii anti-BCMA sunt anticorpi umani. Termenul "anticorp uman", așa cum este utilizat aici, este destinat să includă anticorpi având regiuni variabile și constante derivate din secvențele de imunoglobuline ale liniei germinale umane. Anticorpii umani conform invenției pot include resturi de aminoacizi necodificate de secvențe de imunoglobuline germinale umane (de exemplu, mutații introduse prin mutagenză aleatorie sau specifică locului *in vitro* sau prin mutație somatică *in vivo*), de exemplu în CDR-uri și în special CDR3. Cu toate acestea, termenul "anticorp uman", așa cum este utilizat aici, nu este destinat să includă anticorpi în care secvențele CDR derivate din linia germinativă a unei alte specii de mamifere, cum ar fi un șoarece, au fost grefate pe secvențe cadru umane.

15 Anticorpii pot fi, în unele exemple de realizare, anticorpi umani recombinanți. Termenul "anticorp uman recombinant", așa cum este utilizat aici, este destinat să includă toți anticorpii umani care sunt preparați, exprimați, creați sau izolați prin mijloace recombinante, cum ar fi anticorpii exprimați folosind un vector de expresie recombinant transfecat într-o celulă gazdă (descriș mai jos), anticorpi izolați dintr-o bibliotecă de anticorpi umani recombinanți, combinatori (descriși mai jos), anticorpi izolați de la un animal (de exemplu, un șoarece) care este transgenic pentru genele imunoglobulinei umane (vezi, de exemplu, Taylor et al. (1992) Nucl. Acizi Res. 20:6287-6295) sau anticorpi preparați, exprimați, creați sau izolați prin orice alte mijloace care implică desplicarea secvențelor genei de imunoglobuline umane la alte secvențe ADN. Astfel de anticorpi umani recombinanți au regiuni variabile și constante derivate din secvențele de imunoglobulină germinativă umană. În anumite exemple de realizare, totuși, astfel de anticorpi umani recombinanți sunt supuși mutagenzei *in vitro* (sau, atunci când se utilizează un animal transgenic pentru secvențe de Ig umane, mutagenzei somatice *in vivo*) și astfel secvențele de aminoacizi ale regiunilor V_H și V_L ale anticorpilor recombinanți, sunt secvențe care, deși derivate din și legate de secvențele V_H și V_L ale liniei germinale umane, pot să nu existe în mod natural în repertoriul liniei germinale de anticorpi umani *in vivo*.

25 Anticorpii umani pot exista în două forme care sunt asociate cu eterogenitatea balamalei. Într-o formă, o moleculă de imunoglobulină cuprinde o construcție stabilă cu patru lanțuri de aproximativ 150-160 kDa în care dimerii sunt ținuti împreună printr-o legătură disulfurică a lanțului greu intercatenar. Într-o a doua formă, dimerii nu sunt legați prin legături disulfurice inter-lanț și se formează o moleculă de aproximativ 75-80 kDa compusă dintr-un lanț ușor și greu cuplat covalent (jumătate de anticorp). Aceste forme au fost extrem de greu de separat, chiar și după purificarea prin afinitate.

35 Frecvența de apariție a celei de-a doua forme în diferite izotipuri IgG intacte se datorează, dar nu se limitează la, diferențelor structurale asociate cu izotipul regiunii balama a anticorpului. O singură substituție de aminoacid în regiunea balama a balamalei IgG4 umană poate reduce semnificativ aspectul celei de-a doua forme (Angal și colab. 1993) Molecular Immunology 30:105) la niveluri observate în mod tipic utilizând o balama IgG1 umană. Prezenta invenție cuprinde anticorpi având una sau mai multe mutații în balama, regiunea C_H2 sau C_H3 care pot fi de dorit, de exemplu, în producție, pentru a îmbunătăți randamentul formei de anticorpi dorite.

45 Anticorpii pot fi anticorpi izolați. Un "anticorp izolat", așa cum este utilizat aici, înseamnă un anticorp care a fost identificat și separat și/sau recuperat din cel puțin o componentă a mediului său natural. De exemplu, un anticorp care a fost separat sau îndepărtat din cel puțin o componentă a unui organism, sau dintr-un țesut sau celulă în care anticorpul există în mod natural sau este produs în mod natural, este un "anticorp izolat" pentru scopurile prezentei invenții. Un anticorp izolat include, de asemenea, un anticorp *in situ* într-o celulă recombinată. Anticorpii izolați sunt anticorpi care au fost supuși la cel puțin o etapă de purificare sau izolare. Conform anumitor variante de realizare, un anticorp izolat poate fi în mod substanțial lipsit de alte materiale celulare și/sau substanțe chimice.

50 Anticorpii anti-BCMA dezvăluți aici pot cuprinde una sau mai multe substituții de aminoacizi, inserții și/sau deleții în cadrul și/sau regiunile CDR ale domeniilor variabile ale lanțului greu și ușor în comparație cu secvențele germinale corespunzătoare din care au fost derivați anticorpii. Astfel de mutații pot fi constatate cu ușurință prin compararea secvențelor de aminoacizi dezvăluite aici cu secvențele liniei germinale disponibile, de exemplu, din bazele de date publice de secvențe de anticorpi. 55 Prezenta invenție include anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen, care sunt derivate din oricare dintre secvențele de aminoacizi dezvăluite aici, în care unul sau mai mulți aminoacizi din unul sau mai multe regiuni cadru și/sau CDR sunt mutați la reziduurile corespunzătoare ale secvenței de linie germinativă din care a derivat anticorpul sau la reziduurile corespunzătoare ale altei secvențe de linie germinală umană sau la o substituție conservatoare de aminoacizi a reziduurilor corespunzătoare ale liniei

germinale (astfel de modificări de secvență sunt denumite aici în mod colectiv „mutații ale liniei germinale”). O persoană cu calificare obișnuită în domeniu, începând cu secvențele de regiune variabilă a lanțului greu și ușor descrise aici, poate produce cu ușurință numeroși anticorpi și fragmente de legare la antigen care cuprind una sau mai multe mutații individuale ale liniei germinale sau combinații ale acestora. În anumite variante de realizare, toate resturile cadru și/sau CDR din domeniile V_H și/sau V_L sunt mutate înapoi la resturile găsite în secvența germinativă originală din care a fost derivat anticorpul. În alte exemple de realizare, numai anumite reziduuri sunt mutate înapoi la secvența originală a liniei germinale, de exemplu, numai resturile mutante găsite în primii 8 aminoacizi ai FR1 sau în ultimii 8 aminoacizi ai FR4, sau numai resturile mutante găsite în CDR1, CDR2 sau CDR3. În alte exemple de realizare, unul sau mai multe dintre resturile cadru și/sau CDR sunt mutate la restul (reziduurile) corespunzătoare ale unei secvențe de linie germinală diferită (adică, o secvență de linie germinală care este diferită de secvența de linie germinală din care a fost anticorpul derivat inițial). Mai mult, anticorpii prezentei invenții pot conține orice combinație de două sau mai multe mutații ale liniei germinale în cadrul regiunilor cadru și/sau CDR, de exemplu, în care anumite resturi individuale sunt mutate la restul corespunzător al unei anumite secvențe de linie germinală, în timp ce anumite alte resturi care diferă din secvența originală a liniei germinale sunt menținute sau sunt mutate la reziduu corespunzător al unei secvențe de linie germinală diferită. Odată obținute, anticorpii și fragmentele de legare la antigen care conțin una sau mai multe mutații ale liniei germinale pot fi testate cu ușurință pentru una sau mai multe proprietăți dorite, cum ar fi specificitatea de legare îmbunătățită, afinitatea de legare crescută, proprietățile biologice antagoniste sau agoniste îmbunătățite sau îmbunătățite (după caz). fi), imunogenitate redusă etc. Anticorpii și fragmentele de legare la antigen obținute în acest mod general sunt cuprinse în prezenta dezvăluire.

Anticorpii anti-BCMA pot cuprinde variante ale oricăreia dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR dezvăluite aici având una sau mai multe substituții conservatoare. De exemplu, anticorpii anti-BCMA pot avea secvențe de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR cu, de exemplu, 10 sau mai puține, 8 sau mai puține, 6 sau mai puține, 4 sau mai puține, etc. substituții conservatoare de aminoacizi în raport cu oricare. dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR prezentate aici.

Termenul "epitop" se referă la un determinant antigenic care interacționează cu un situs specific de legare a antigenului în regiunea variabilă a unei molecule de anticorp cunoscută ca paratop. Un singur antigen poate avea mai mult de un epitop. Astfel, anticorpi diferiți se pot lega la diferite zone ale unui antigen și pot avea efecte biologice diferite. Epitopii pot fi fie conformaționali, fie liniari. Un epitop conformațional este produs de aminoacizi juxtapași spațial din diferite segmente ale lanțului polipeptidic linear. Un epitop liniar este unul produs de resturile de aminoacizi adiacente dintr-un lanț polipeptidic. În anumite circumstanțe, un epitop poate include fragmente de zaharide, grupări fosforil sau grupări sulfonil de pe antigen.

Termenul „identitate substanțială” sau „substanțial identic”, atunci când se referă la un acid nucleic sau fragment al acestuia, indică faptul că, atunci când este aliniat în mod optim cu inserții sau deleții adecvate de nucleotide cu un alt acid nucleic (sau catena sa complementară), există identitate de secvență de nucleotide. În cel puțin aproximativ 95% și mai preferabil cel puțin aproximativ 96%, 97%, 98% sau 99% din baze nucleotidice, măsurate prin orice algoritm binecunoscut de identitate de secvență, cum ar fi FASTA, BLAST sau Gap, ca discutat mai jos. O moleculă de acid nucleic având identitate substanțială cu o moleculă de acid nucleic de referință poate, în anumite cazuri, să codifice o polipeptidă având aceeași secvență de aminoacizi sau substanțial similară cu polipeptida codificată de molecula de acid nucleic de referință.

Așa cum se aplică polipeptidelor, termenul „asemănare substanțială” sau „substanțial asemănător” înseamnă că două secvențe de peptide, atunci când sunt aliniat optim, cum ar fi prin programele GAP sau BESTFIT, folosind ponderi implicite ale intervalului, împărtășesc cel puțin 95% identitate de secvență, chiar mai preferabil. cel puțin 98% sau 99% identitate de secvență. De preferință, pozițiile reziduurilor care nu sunt identice diferă prin substituții conservatoare de aminoacizi. O „substituție conservatoare de aminoacid” este una în care un rest de aminoacid este substituit cu un alt rest de aminoacid având o catenă laterală (grupare R) cu proprietăți chimice similare (de exemplu, sarcină sau hidrofobicitate). În general, o substituție conservatoare a aminoacizilor nu va schimba substanțial proprietățile funcționale ale unei proteine. În cazurile în care două sau mai multe secvențe de aminoacizi diferă una de cealaltă prin substituții conservatoare, identitatea secvenței procentuale sau gradul de similaritate poate fi ajustat în sus pentru a corecta natura conservatoare a substituției. Mijloacele pentru realizarea acestei ajustări sunt binecunoscute specialiștilor în domeniu. Vezi, de exemplu, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Exemple de grupuri de aminoacizi care au catene laterale cu proprietăți chimice similare includ (1) catene laterale alifactice: glicină, alanină, valină, leucină și izoleucină; (2)

catene laterale alifatic-hidroxiol: serină și treonină; (3) lanțuri laterale care conțin amidă: asparagină și glutamina; (4) lanțuri laterale aromatice: fenilalanină, tirozină și triptofan; (5) lanțuri laterale de bază: lizină, arginină și histidină; (6) lanțuri laterale acide: aspartat și glutamat și (7) lanțuri laterale care conțin sulf sunt cisteină și metionină. Grupările de substituție a aminoacizilor conservatoare preferate sunt:

5 valină-leucină-izoleucină, fenilalanină-tirozină, lizină-arginină, alanină-valină, glutamat-aspartat și asparagină-glutamina. Alternativ, o înlocuire conservatoare este orice modificare care are o valoare pozitivă în matricea log-probabilității PAM250 dezvoltată în Gonnet și colab. (1992) Science 256: 1443-1445. O înlocuire „moderat conservatoare” este orice modificare care are o valoare nenegativă în matricea log-probabilității PAM250.

10 Asemănarea secvenței pentru polipeptide, la care se face referire și ca identitate de secvență, este măsurată în mod obișnuit folosind software-ul de analiză a secvenței. Software-ul de analiză a proteinelor potrivește secvențe similare folosind măsuri de similitudine atribuite diferitelor substituții, deleții și alte modificări, inclusiv substituții conservatoare de aminoacizi. De exemplu, software-ul GCG conține programe precum Gap și Bestfit care pot fi utilizate cu parametrii implicați pentru a determina omologia

15 secvenței sau identitatea secvenței între polipeptide strâns legate, cum ar fi polipeptide omoloage din diferite specii de organisme sau între o proteină de tip sălbatic și o muteină a acesteia. . Vezi, de exemplu, GCG Versiunea 6.1. Secvențele de polipeptide pot fi, de asemenea, comparate folosind FASTA utilizând parametrii implicați sau recomandați, un program din GCG Versiunea 6.1. FASTA (de exemplu, FASTA2 și FASTA3) furnizează aliniamente și identitate de secvență procentuală a regiunilor cu cea mai bună

20 suprapunere între secvențele de interogare și de căutare (Pearson (2000) supra). Un alt algoritm preferat atunci când se compară o secvență a invenției cu o bază de date care conține un număr mare de secvențe din diferite organisme este programul de calculator BLAST, în special BLASTP sau TBLASTN, folosind parametrii implicați. Vezi, de exemplu, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 și Altschul și colab. (1997) Acizi nucleici Res. 25:3389-402.

25 Așa cum sunt utilizați aici, termenii "acid nucleic" sau "polinucleotide" se referă la nucleotide și/sau polinucleotide, cum ar fi acid dezoxiribonucleic (ADN) sau acid ribonucleic (ARN), oligonucleotide, fragmente generate de reacția în lanț a polimerazei (PCR) și fragmente generate de acțiunea de ligatură, scisare, endonuclează și exonuclează. Moleculele de acid nucleic pot fi compuse din monomeri care sunt nucleotide naturale (cum ar fi ADN și ARN) sau analogi ai nucleotidelor naturale (de

30 exemplu, forme enantiomerice ale nucleotidelor naturale) sau o combinație a ambelor. Nucleotidele modificate pot avea modificări ale fragmentelor de zahăr și/sau ale fragmentelor de bază pirimidină sau purinică. Modificările zahărului includ, de exemplu, înlocuirea uneia sau mai multor grupări hidroxiol cu halogeni, grupări alchil, amine și grupări azido, sau zaharurile pot fi funcționalizate ca eteri sau esteri. Mai mult, întregul fragment de zahăr poate fi înlocuit cu structuri similare sterile și electronice, cum ar fi

35 zaharuri aza și analogi de zahăr carbociclic. Exemple de modificări ale unui fragment de bază includ purine și pirimidine alchilate, purine sau pirimidine acilate sau alți substituenți heterociclici bine cunoscuți. Monomerii acizilor nucleici pot fi legați prin legături fosfodiester sau analogi ai unor astfel de legături. Acizii nucleici pot fi fie monocatenari, fie dublu catenari.

40 Termenul „receptor de antigen himeric” (CAR) se referă la molecule care combină un domeniu de legare împotriva unui component prezent pe celula țintă, de exemplu o specificitate bazată pe anticorpi pentru un antigen dorit (de exemplu, un antigen tumoral, cum ar fi BCMA) cu un domeniu intracelular care activează receptorul celulei T pentru a genera o proteină himerică care prezintă o activitate imună

45 celulară anti-țintă specifică. În general, CAR-urile constau dintr-un domeniu de legare a anticorpilor cu lanț unic extracelular (scFv) fuzionat cu domeniul de semnalizare intracelular al lanțului zeta al complexului receptor al antigenului celulelor T și au capacitatea, atunci când sunt exprimate în celulele T, de a redirecționa recunoașterea antigenului pe baza specificitatea anticorpului monoclonal.

Termenul "vector", așa cum este utilizat aici, include, dar nu se limitează la, un vector viral, o plasmidă, un vector ARN sau o moleculă de ADN sau ARN liniară sau circulară care poate consta din cromozomiale, necromozomiale, semisintetice sau acizi nucleici sintetici. În unele cazuri, vectorii sunt

50 cei capabili de replicare autonomă (vector epizomal) și/sau expresie a acizilor nucleici de care sunt legați (vectori de expresie). Un număr mare de vectori adecvați sunt cunoscuți de specialiștii în domeniu și sunt disponibili comercial. Vectorii virali includ retrovirus, adenovirus, parvovirus (de exemplu, virusuri adenoasociate), coronavirus, virusuri ARN cu catenă negativă, cum ar fi orthomyxovirus (de exemplu, virusul gripal), rabdovirus (de exemplu, virusul rabiei și stomatitei veziculoase), paramixovirus (de

55 exemplu, rujeola și Sendai), virusuri ARN cu catenă pozitivă, cum ar fi picornavirus și alfavirus și virusuri ADN dublu catenar, inclusiv adenovirus, herpesvirus (de exemplu, virusul Herpes Simplex tipurile 1 și 2, virusul Epstein-Barr, citomegalovirus) și poxvirus (de exemplu, vaccinia, variola aviară și variola). Alți viruși includ virusul Norwalk, togavirusul, flavivirusul, reovirusurile, papovavirusul,

hepadnavirusul și virusul hepatitei, de exemplu. Exemple de retrovirusuri includ: leucoză aviară-sarcom, virusuri de tip C mamifer, tip B, virusuri de tip D, grup HTLV-BLV și lentivirus.

Un „domeniu costimulator” sau „moleculă costimulatoare” se referă la partenerul de legare înrudit pe o celulă T care se leagă în mod specific cu un ligand costimulator, mediind astfel un răspuns costimulator al celulei, cum ar fi, dar fără a se limita la proliferare. Moleculele costimulatoare includ, dar nu sunt limitate la, o moleculă MHC clasa I, BTLA și receptorul de ligand Toll. Exemple de molecule costimulatoare includ CD27, CD28, CD8, 4-1 BB (CD137) (SECV ID NR: 99), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antigen-1 asociat funcției limfocitelor (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 și un ligand care se leagă în mod specific cu CD83 și altele asemenea. O moleculă de costimulare este o moleculă de suprafață celulară, alta decât un receptor de antigen sau liganzii acestora, care este necesar pentru un răspuns imun eficient.

Un "ligand costimulator" se referă la o moleculă de pe o celulă prezentatoare de antigen care leagă în mod specific o moleculă costimulatoare înrudită pe o celulă T, furnizând astfel un semnal care, în plus față de semnalul primar furnizat, de exemplu, de legarea unui TCR/ Complexul CD3 cu o moleculă MHC încărcată cu peptidă, mediază un răspuns celulei T, incluzând, dar fără a se limita la, activarea proliferării, diferențierea și altele asemenea. Un ligand costimulator poate include, dar nu este limitat la, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1 BBL, OX40L, ligand costimulator inductibil (ICOS-L), moleculă de adeziune intercelulară (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de limfotoxină beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, un agonist sau anticorp care leagă receptorul ligandului Toll și un ligand care se leagă în mod specific cu B7-H3.

Un "semnal costimulator" se referă la un semnal, care în combinație cu un semnal primar, cum ar fi ligatura TCR/CD3, conduce la proliferarea celulelor T și/sau reglarea în sus sau în jos a moleculelor cheie.

Termenul "domeniu de legare a ligandului extracelular", așa cum este utilizat aici, se referă la o oligo- sau polipeptidă care este capabilă să lege un ligand, de exemplu, o moleculă de suprafață celulară. De exemplu, domeniul extracelular de legare a ligandului poate fi ales pentru a recunoaște un ligand care acționează ca un marker de suprafață celulară pe celulele țintă asociate cu o anumită stare de boală (de exemplu, cancer). Exemple de markeri de suprafață celulară care pot acționa ca liganzi includ pe cei asociați cu infecții virale, bacteriene și parazitare, boli autoimune și celule canceroase.

Termenul "subiect" sau "pacient" așa cum este utilizat aici include toți membrii regnului animal, incluzând primatele non-umane și oamenii. Într-o variantă de realizare, pacienții sunt oameni cu un cancer (de exemplu, mielom multiplu).

Un „domeniu de transducere a semnalului” sau „domeniu de semnalizare” al unui CAR, așa cum este utilizat aici, este responsabil pentru semnalizarea intracelulară în urma legării unui domeniu de legare a ligandului extracelular la țintă, rezultând în activarea celulei imune și a răspunsului imun. Cu alte cuvinte, domeniul de transducere a semnalului este responsabil pentru activarea a cel puțin uneia dintre funcțiile efectoare normale ale celulei imune în care este exprimat CAR. De exemplu, funcția efector a unei celule T poate fi o activitate citolitică sau o activitate auxiliară incluzând secreția de citokine. Astfel, termenul "domeniu de transducere a semnalului" se referă la porțiunea unei proteine care transduce semnalul funcției efectoare și direcționează celula să îndeplinească o funcție specializată. Exemple de domenii de transducere a semnalului pentru utilizare într-un CAR pot fi secvențele citoplasmice ale receptorului celulelor T și ale co-receptorilor care acționează în mod concertat pentru a iniția transducția semnalului după angajarea receptorului antigen, precum și orice derivat sau variantă a acestor secvențe și orice sintetic secvență care are aceeași capacitate funcțională. În unele cazuri, domeniile de semnalizare cuprind două clase distincte de secvențe de semnalizare citoplasmică, cele care inițiază activarea primară dependentă de antigen și cele care acționează într-o manieră independentă de antigen pentru a furniza un semnal secundar sau co-stimulator. Secvențele de semnalizare citoplasmică primară pot cuprinde motive de semnalizare care sunt cunoscute ca motive de activare pe bază de tirozină imunoreceptoare ale ITAM-urilor. ITAM-urile sunt motive de semnalizare bine definite găsite în coada intracitoplasmică a unei varietăți de receptori care servesc ca situsuri de legare pentru tirozin kinazele din clasa syk/zap70. Exemplele de ITAM includ pe cele derivate din TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, FcRepsilon, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b și CD66d. În unele exemple de realizare, domeniul de transducere a semnalului al CAR poate cuprinde domeniul de semnalizare CD3zeta (SEQ ID NR: 100).

55 **Receptori de antigen himerici (CAR)**

Receptorii antigenului himeric (CAR) redirecționează specificitatea celulelor T către antigeni recunoscuți de anticorpi exprimați pe suprafața celulelor (de exemplu, celulele canceroase), în timp ce receptorii de celule T (TCR) extind gama de ținte pentru a include antigene intracelulare (de exemplu, antigene tumorale).

Un aspect al prezentei invenții include un receptor de antigen himeric (CAR) care este specific pentru un antigen de maturare a celulelor B (BCMA) exprimat pe suprafața celulelor plasmactice maligne. În invenție, CAR-ul cuprinde un domeniu extracelular de legare specifică țintei, un domeniu transmembranar, un domeniu de semnalizare intracelular (derivat din CD3zeta) și/sau unul sau mai multe domenii de semnalizare co-stimulatoare derivate dintr-o moleculă co-stimulatoare (4-1 BB). Într-o variantă de realizare, CAR-ul include o balama sau o regiune distanțier între domeniul de legare extracelular și domeniul transmembranar, cum ar fi o balama CD8alfa.

Domeniul de legare sau domeniul extracelular al CAR oferă CAR-ului capacitatea de a se lega la antigenul țintă de interes. Un domeniu de legare (de exemplu, un domeniu de legare a ligandului sau domeniu de legare a antigenului) poate fi orice proteină, polipeptidă, oligopeptidă sau peptidă care posedă capacitatea de a recunoaște și de a se lega în mod specific la o moleculă biologică (de exemplu, un receptor de suprafață celulară sau o proteină tumorală sau o componentă a acesteia). Un domeniu de legare include orice partener de legare natural, sintetic, semi-sintetic sau produs recombinant pentru o moleculă biologică de interes. De exemplu, și așa cum este descris în continuare aici, un domeniu de legare poate fi regiuni variabile ale lanțului ușor și al lanțului greu al anticorpului, sau regiunile variabile ale lanțului ușor și greu pot fi unite împreună într-un singur lanț și în oricare orientare (de exemplu, V_L - V_H sau V_H - V_L). Sunt cunoscute o varietate de teste pentru identificarea domeniilor de legare ale prezentei dezvoltării care se leagă în mod specific cu o țintă particulară, incluzând Western blot, ELISA, citometria în flux sau analiza rezonanței plasmonilor de suprafață (de exemplu, folosind analiza BIACORE). Ținta poate fi un antigen de interes clinic împotriva căruia ar fi de dorit să se declanșeze un răspuns imun efector care are ca rezultat uciderea tumorii. Într-o variantă de realizare, antigenul țintă al domeniului de legare al receptorului de antigen himeric este o proteină BCMA de pe suprafața celulelor tumorale, în special, celule tumorale din linia celulelor B, cum ar fi celulele de mielom multiplu.

Domeniile ilustrative de legare a ligandului includ proteine de legare la antigen, cum ar fi fragmente de legare la antigen ale unui anticorp, cum ar fi scFv, scTCR, domenii extracelulare ale receptorilor, liganzi pentru moleculele/receptorii de suprafață celulară sau domeniile de legare la receptor ale acestora și proteinele de legare a tumorii. În anumite realizări, domeniile de legare la antigen incluse într-un CAR al invenției pot fi o regiune variabilă (Fv), un CDR, un Fab, un scFv, un V_H , un V_L , o variantă de anticorp de domeniu (dAb), un anticorp de camelidă (V_{HH}), o variantă de domeniu de fibronectină 3, o variantă de repetare a anchirinei și alt domeniu de legare specific antigenului derivat din alte schele de proteine. În invenție, domeniul de legare este un scFv.

Într-un aspect al dezvoltării, domeniul de legare al CAR este un anticorp cu lanț unic anti-BCMA (scFv) și poate fi un scFv murin, uman sau umanizat. Anticorpii cu un singur lanț pot fi donați din genele regiunii V ale unui hibridom specific pentru o țintă dorită. O tehnică care poate fi utilizată pentru donarea lanțului greu din regiune variabilă (V_H) și lanțului ușor al regiunii variabile (V_L) a fost descrisă, de exemplu, în Orlandi și colab., PNAS, 1989; 86: 3833-3837. Astfel, în anumite aspecte ale dezvoltării, un domeniu de legare cuprinde un domeniu de legare derivat de anticorp, dar poate fi un domeniu de legare non derivat de anticorp. Un domeniu de legare derivat de anticorp poate fi un fragment al unui anticorp sau un produs modificat genetic al unuia sau mai multor fragmente ale anticorpului, fragment care este implicat în legarea cu antigenul.

În anumite variante de realizare, CAR-urile prezentei invenții pot cuprinde un linker între diferitele domenii, adăugat pentru distanțarea și conformarea corespunzătoare a moleculei. De exemplu, într-o variantă de realizare, poate exista un linker între domeniul de legare V_H sau V_L care poate avea o lungime între 1-10 aminoacizi. În alte exemple de realizare, linkerul dintre oricare dintre domeniile receptorului de antigen himeric poate avea o lungime între 1-20 sau 20 de aminoacizi. În această privință, linkerul poate avea 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 sau 20 de aminoacizi. În alte realizări, linkerul poate avea 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30 de aminoacizi. Intervalele care includ numerele descrise aici sunt de asemenea incluse aici, de exemplu, un linker lung de 10-30 aminoacizi.

În anumite variante de realizare, linkerii adecvați pentru utilizare în CAR descrise aici sunt linkerii flexibili. Linkerii adecvați pot fi selectați cu ușurință și pot avea oricare dintre lungimi adecvate, cum ar fi de la 1 aminoacid (de exemplu, Gly) la 20 aminoacizi, de la 2 aminoacizi la 15 aminoacizi, de la 3 aminoacizi la 12 aminoacizi, inclusiv 4 aminoacizi la 10 aminoacizi, 5 aminoacizi la 9 aminoacizi, 6 aminoacizi la 8 aminoacizi sau 7 aminoacizi la 8 aminoacizi și pot fi 1, 2, 3, 4, 5, 6, sau 7 aminoacizi.

Exemple de linkerii flexibili includ polimeri de glicină (G)_n, polimeri de glicină-serină, unde n este un număr întreg de cel puțin unul, polimeri de glicină-alanină, polimeri de alanină-serină și alți linkerii flexibili cunoscuți în domeniu. Polimerii de glicină și glicină-serină sunt relativ nestructurați și, prin urmare, pot fi capabili să servească ca o legătură neutră între domeniile proteinelor de fuziune, cum

ar fi CAR-urile descrise aici. Glicina accesează mult mai mult spațiu phi-psi decât chiar și alanina și este mult mai puțin restricționată decât reziduurile cu lanțuri laterale mai lungi (vezi Scheraga, Rev. Chimie computațională. 11173-142 (1992)). Specialistul în domeniu va recunoaște că proiectarea unui CAR poate include linkerii care sunt total sau parțial flexibili, astfel încât linkerul poate include un linker flexibil precum și una sau mai multe porțiuni care conferă o structură mai puțin flexibilă pentru a asigura o structură CAR dorită. Linkerii specifici includ linkerii (G4S)_n, în care n=1-3, așa cum se arată în SECV ID NR: 95-97, precum și linkerul prezentat în SECV ID NR: 96.

Domeniul de legare al CAR poate fi urmat de un „distanțier” sau „balama”, care se referă la regiunea care mută domeniul de legare a antigenului departe de suprafața celulei efectoare pentru a permite contactul adecvat celulă/celulă, legarea și activarea antigenului. (Patel și colab., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). Regiunea balama într-un CAR este în general între transmembrană (TM) și domeniul de legare. În anumite variante de realizare, o regiune balama este o regiune balama de imunoglobulină și poate fi o regiune balama de imunoglobulină de tip sălbatic sau o regiune balama de imunoglobulină de tip sălbatic modificată. Alte regiuni balama exemplificative utilizate în CAR-urile descrise aici includ regiunea balama derivată din regiunile extracelulare ale proteinelor membranare de tip 1, cum ar fi CD8alfa, CD4, CD28 și CD7, care pot fi regiuni balama de tip sălbatic din aceste molecule sau pot fi modificate. Într-o variantă de realizare, regiunea balama cuprinde o balama CD8alfa (SECV ID NR: 97).

Regiunea sau domeniul „transmembranar” este porțiunea CAR care ancorează porțiunea de legare extracelulară la membrana plasmatică a celulei efectoare imune și facilitează legarea domeniului de legare la antigenul țintă. Domeniul transmembranar poate fi un domeniu transmembranar CD3zeta, cu toate acestea, alte domenii transmembranare care pot fi folosite includ pe cele obținute de la CD8alfa, CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 și CD154. Într-o variantă de realizare, domeniul transmembranar este domeniul transmembranar al CD137. În unele exemple de realizare, domeniul transmembranar cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 98. În anumite variante de realizare, domeniul transmembranar este sintetic, caz în care ar cuprinde reziduuri predominant hidrofobe, cum ar fi leucină și valină.

„Domeniul de semnalizare intracelular” sau „domeniul de semnalizare” se referă la partea proteinei receptorului antigen himeric care participă la transducerea mesajului de legare eficientă a CAR la un antigen țintă în interiorul celulei efectoare imune pentru a determina funcția celulei efectoare, de ex. , activarea, producția de citokine, proliferarea și activitatea citotoxică, inclusiv eliberarea de factori citotoxici către celula țintă legată de CAR sau alte răspunsuri celulare provocate cu legarea antigenului la domeniul CAR extracelular. Termenul „funcție efector” se referă la o funcție specializată a celulei. Funcția efector a celulei T, de exemplu, poate fi activitate citolitică sau ajutor sau activitate incluzând secreția unei citokine. Astfel, termenii „domeniu de semnalizare intracelular” sau „domeniu de semnalizare”, utilizați în mod interschimbabil aici, se referă la porțiunea unei proteine care transduce semnalul funcției efectoare și care direcționează celula să îndeplinească o funcție specializată.

În timp ce de obicei întregul domeniu de semnalizare intracelular poate fi folosit, în multe cazuri nu este necesar să se utilizeze întregul domeniu. În măsura în care se utilizează o porțiune trunchiată a unui domeniu de semnalizare intracelular, o astfel de porțiune trunchiată poate fi utilizată în locul întregului domeniu atâta timp cât transduce semnalul funcției efectoare. Termenul domeniu de semnalizare intracelular este menit să includă orice porțiune trunchiată a domeniului de semnalizare intracelular suficientă pentru a transduce semnalul funcției efectoare. Domeniul de semnalizare intracelular este, de asemenea, cunoscut ca „domeniu de transducție a semnalului” și este derivat în mod obișnuit din porțiuni ale lanțurilor CD3 sau FcRy umane.

Se știe că semnalele generate numai prin receptorul celulei T sunt insuficiente pentru activarea completă a celulei T și că este de asemenea necesar un semnal secundar sau costimulator. Astfel, se poate spune că activarea celulelor T este mediată de două clase distincte de secvențe de semnalizare citoplasmatică: cele care inițiază activarea primară dependentă de antigen prin receptorul celulelor T (secvențe primare de semnalizare citoplasmatică) și cele care acționează într-o manieră independentă de antigen pentru a oferi o semnal secundar sau costimulator (secvențe secundare de semnalizare citoplasmatică). Secvențele de semnalizare citoplasmatică care acționează într-o manieră costimulatoare pot conține motive de semnalizare care sunt cunoscute ca motiv de activare pe bază de tirozină imunoreceptor sau ITAM.

Exemple de ITAM care conțin secvențe de semnalizare citoplasmatică primară care sunt de utilizare specială în invenție le includ pe cele derivate din TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b și CD66d. În invenție, domeniul de semnalizare intracelular al CAR anti-BCMA al invenției este derivat din CD3zeta. În unele exemple de realizare, domeniul de semnalizare cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 100.

Așa cum este utilizat aici, termenul "domeniu de semnalizare costimulator" sau "domeniu costimulator", se referă la porțiunea CAR care cuprinde domeniul intracelular al unei molecule costimulatoare. Moleculele costimulatoare sunt molecule de suprafață celulară, altele decât receptorii de antigen sau receptorii Fc, care furnizează un al doilea semnal necesar pentru activarea și funcționarea eficientă a limfocitelor T la legarea la antigen. Exemple de astfel de molecule co-stimulatoare includ CD27, CD28, 4-1 BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C, B7-H2 și un ligand care leagă în mod specific CD83. În consecință, în timp ce prezenta dezbătută furnizează exemple de domenii costimulatoare derivate din CD3zeta și 4-1 BB, alte domenii costimulatoare sunt avute în vedere pentru utilizare cu CAR-urile descrise aici. Incluzerea unuia sau mai multor domenii de semnalizare co-stimulatoare poate spori eficacitatea și expansiunea celulelor T care exprimă receptorii CAR. Domeniile de semnalizare intracelulară și de semnalizare costimulatoare pot fi legate în orice ordine în tandem la capătul carboxil terminal al domeniului transmembranar. În unele realizări, domeniul costimulator cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 99.

Deși s-a demonstrat că CAR-urile bazate pe scFv concepute pentru a conține un domeniu de semnalizare de la CD3 sau FcRgamma oferă un semnal puternic pentru activarea celulelor T și funcția efectoră, ele nu sunt suficiente pentru a genera semnale care promovează supraviețuirea și expansiunea celulelor T în absența unui semnal costimulator concomitent. Alte CAR-uri care conțin un domeniu obligatoriu, o balama, o transmembrană și domeniul de semnalizare derivat din CD3zeta sau FcRgamma împreună cu unul sau mai multe domenii de semnalizare costimulatoare (de exemplu, domenii costimulatoare intracelulare derivate din CD28, CD137, CD134 și CD278) pot direcționa mai eficient activitatea antitumorală, precum și secreția crescută de citokine, activitatea litică, supraviețuirea și proliferarea în celulele T care exprimă CAR in vitro și la modelele animale și la pacienții cu cancer (Milone și colab., *Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong și colab., *Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito și colab., *PNAS*, 2009; 106:3360-3365).

În diferite variante de realizare, CAR-urile BCMA ale invenției cuprind (a) un scFv anti-BCMA ca domeniu de legare (de exemplu, un scFv având regiuni de legare (de exemplu, CDR-uri sau domenii variabile) de la oricare sau mai mulți anticorpi BCMA identificați în Tabelul 1) (b) o regiune balama derivată din CD8alfa uman, (c) un domeniu transmembranar CD8alfa uman și (d) un domeniu de semnalizare intracelular al lanțului zeta CD3 al receptorului de celule T umane (CD3) și, opțional, unul sau mai multe domenii de semnalizare costimulatoare, de exemplu, 4-1 BB. Într-o variantă de realizare, diferitele domenii proteice sunt aranjate de la capătul amino la capătul carboxil în următoarea ordine: domeniul de legare, regiunea balama și domeniul transmembranar. Domeniul de semnalizare intracelular și domeniile de semnalizare co-stimulatoare opționale sunt legate la capătul carboxil transmembranar în orice ordine în tandem pentru a forma o polipeptidă himerică cu un singur lanț. Într-o variantă de realizare, un construct de acid nucleic care codifică un BCMA CAR este o moleculă de acid nucleic himeric care cuprinde o moleculă de acid nucleic care cuprinde diferite secvențe de codificare, de exemplu, (5' până la 3') secvențele de codificare ale unui scFv uman anti-BCMA, un balama CD8alfa umană, un domeniu transmembranar CD8alfa uman și un domeniu de semnalizare intracelular CD3zeta. Într-o altă variantă de realizare, un construct de acid nucleic care codifică un BCMA CAR este o moleculă de acid nucleic himeric care cuprinde o moleculă de acid nucleic care cuprinde diferite secvențe de codificare, de exemplu, (5' până la 3') secvențele de codificare ale unui scFv uman anti-BCMA, un balama CD8alfa umană, un domeniu transmembranar CD8alfa uman, un domeniu co-stimulator 4-1 BB și un domeniu co-stimulator CD3zeta.

În anumite variante de realizare, polinucleotida care codifică CAR descrisă aici este inserată într-un vector. Vectorul este un vehicul în care o polinucleotidă care codifică o proteină poate fi inserată covalent astfel încât să producă expresia acelei proteine și/sau donarea polinucleotidei. Astfel de vectori pot fi denumiți, de asemenea, ca "vectori de expresie". Polinucleotida izolată poate fi inserată într-un vector utilizând orice metode adecvate cunoscute în domeniu, de exemplu, fără limitare, vectorul poate fi digerat utilizând enzime de restricție adecvate și apoi poate fi ligat cu polinucleotida izolată având capete de restricție potrivite. Vectorii de expresie au capacitatea de a încorpora și exprima secvențe de acid nucleic heterologe sau modificate care codifică cel puțin o parte dintr-un produs genic capabil să fie transcris într-o celulă. În cele mai multe cazuri, moleculele de ARN sunt apoi traduse într-o proteină. Vectorii de expresie pot conține o varietate de secvențe de control, care se referă la secvențe de acid nucleic necesare pentru transcrierea și eventual traducerea unei secvențe de codificare legate operativ într-un anumit organism gazdă. În plus față de secvențele de control care guvernează transcripția și translația, vectorii și vectorii de expresie pot conține secvențe de acid nucleic care servesc și alte funcții și sunt discutate mai jos. Un vector de expresie poate cuprinde elemente suplimentare, de exemplu, vectorul de expresie poate avea două sisteme de replicare, permițându-i astfel să fie menținut în două organisme, de exemplu în celule umane pentru exprimare și într-o gazdă procariotă pentru donare și amplificare.

Vectorul de expresie poate avea elementele de reglare necesare 5' în amonte și 3' în aval, cum ar fi secvențele promotoare cum ar fi promotorii CMV, PGK și EF1 alfa, recunoașterea ribozomilor și caseta TATA de legare și secvența de terminare a transcripției 3' UTR AAUAAA pentru transcrierea eficientă a genei și translație în celula gazdă respectivă. Alți promotori adecvați includ promotorul constitutiv al virusului simian 40 (SV40) promotor timpuriu, virusul tumorii mamare la șoarece (MMTV), promotorul HIV LTR, promotorul MoMuLV, promotorul virusului leucemiei aviare, promotorul precoce imediat EBV și promotorul virusului sarcomului rous. Pot fi utilizați, de asemenea, promotori ai genei umane, incluzând, dar fără a se limita la, promotorul de actină, promotorul miozinei, promotorul hemoglobinei și promotorul creatin kinazei. În anumite variante de realizare, promotorii inductibili sunt de asemenea considerați ca parte a vectorilor care exprimă receptorul de antigen himeric. Aceasta oferă un comutator molecular capabil să activeze expresia secvenței de polinucleotide de interes sau să oprească expresia. Exemple de promotori inductibili includ, dar nu se limitează la un promotor de metalotionină, un promotor de glucocorticoid, un promotor de progesteron sau un promotor de tetraciclina.

Vectorul de expresie poate avea o secvență suplimentară, cum ar fi etichete 6x-histidină, c-Myc și FLAG care sunt încorporate în CAR-urile exprimate. Astfel, vectorul de expresie poate fi proiectat pentru a conține secvențe reglatoare netraduse 5' și 3' care uneori pot funcționa ca secvențe amplificatoare, regiuni promotoare și/sau secvențe terminatoare care pot facilita sau îmbunătăți transcripția eficientă a acidului nucleic de interes transportat. pe vectorul de expresie. Un vector de expresie poate fi, de asemenea, proiectat pentru replicare și/sau funcționalitate de expresie (de exemplu, transcripție și translație) într-un anumit tip de celulă, locație celulară sau tip de țesut. Vectorii de expresie pot include un marker selectabil pentru menținerea vectorului în celula gazdă sau receptor.

În diferite variante de realizare, vectorii sunt plasmide, secvențe cu replicare autonomă și elemente transpozabile. Vectori exemplificativi suplimentari includ, fără limitare, plasmide, fagemide, cosmide, cromozomi artificiali, cum ar fi cromozomul artificial de drojdie (YAC), cromozomul artificial bacterian (BAC) sau cromozomul artificial derivat din P1 (PAC), bacteriofagi precum fagul lambda sau fagul M13, și virusuri animale. Exemple de categorii de virusi animale utili ca vectori includ, fără limitare, retrovirus (inclusiv lentivirus), adenovirus, virus adeno-asociat, herpesvirus (de exemplu, virus herpes simplex), poxvirus, baculovirus, papilomavirus și papovavirus (de exemplu, SV40). Exemple de vectori de expresie sunt vectori Lenti-X™ Bicistronic Expression System (Neo) (Clontech), vectori pCIneo (Promega) pentru exprimare în celule de mamifere; pLenti4/V5-DEST.TM., pLenti6/V5-DEST.TM. și pLenti6.2N5-GW/lacZ (Invitrogen) pentru transferul genelor mediate de lentivirus și expresia în celulele de mamifere. Secvențele de codificare ale CAR-urilor dezvoltate aici pot fi legate în astfel de vectori de expresie pentru exprimarea proteinei himerice în celulele de mamifere.

În anumite variante de realizare, acizii nucleici care codifică CAR din prezenta invenție sunt furnizați într-un vector viral. Un vector viral poate fi cel derivat din retrovirus, lentivirus sau virus spumos. Așa cum este utilizat aici, termenul "vector viral" se referă la un construct de vector de acid nucleic care include cel puțin un element de origine virală și are capacitatea de a fi ambalat într-o particulă de vector viral. Vectorul viral poate conține secvența de codificare pentru diferitele proteine himerice descrise aici în locul genelor virale neesențiale. Vectorul și/sau particula pot fi utilizate în scopul transferului de ADN, ARN sau alți acizii nucleici în celule fie in vitro, fie in vivo. Numeroase forme de vectori virali sunt cunoscute în domeniu.

În anumite variante de realizare, vectorul viral care conține secvența de codificare pentru un CAR descris aici este un vector retroviral sau un vector lentiviral. Termenul "vector retroviral" se referă la un vector care conține elemente genetice structurale și funcționale care sunt derivate în principal dintr-un retrovirus. Termenul "vector lentiviral" se referă la un vector care conține elemente genetice structurale și funcționale din afara LTR-urilor care sunt derivate în principal dintr-un lentivirus.

Vectorii retrovirali pentru utilizare aici pot fi derivați de la orice retrovirus cunoscut (de exemplu, retrovirusuri de tip c, cum ar fi virusul sarcomului murin Moloney (MoMSV), virusul sarcomului murin Harvey (HaMuSV), virusul tumorii mamare murine (MuMTV), virusul leucemiei maimuțelor gibbon. (GaLV), virusul leucemiei feline (FLV), virusul spuma, Friend, virusul celulelor stem murine (MSCV) și virusul sarcomului Rous (RSV)). Retrovirusii conform invenției includ, de asemenea, virusi de leucemie cu celule T umane, HTLV-1 și HTLV-2, și familia lentivirală de retrovirusuri, cum ar fi virusurile imunodeficienței umane, HIV-1, HIV-2, virusul imunodeficienței simiane (SIV), feline. virusul imunodeficienței (FIV), virusul imodeficienței ecvine (EIV) și alte clase de retrovirusuri.

Un vector lentiviral pentru utilizare aici se referă la un vector derivat dintr-un lentivirus, un grup (sau gen) de retrovirusuri care dau naștere la o boală cu dezvoltare lentă. Virusii incluși în acest grup includ HIV (virusul imunodeficienței umane; inclusiv HIV tip 1 și HIV tip 2); visna-maedi; un virus al artritei-encefalitei caprine; virusul anemiei infecțioase ecvine; virusul imunodeficienței feline (FIV); virusul imunodeficienței bovine (BIV); și virusul imunodeficienței simiane (SIV). Prepararea

lentivirusului recombinant poate fi realizată utilizând metodele conform lui Dull și colab. și Zufferey și colab. (Dull și colab., J. Virol., 1998; 72: 8463-8471 și Zufferey și colab., J. Virol. 1998; 72:9873- 9880).

Vectorii retrovirali (adică atât lentivirali, cât și non-lentivirale) pentru utilizare în prezenta invenție pot fi formați folosind tehnici standard de donare prin combinarea secvențelor ADN dorite în ordinea și orientarea descrise aici (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. și colab. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secțiunile 9.10-9.14 și alte manuale standard de laborator; Eglitis și colab. (1985) Science 230:1395-1398; Danos și Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464; Wilson și colab. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. SUA 85:3014-3018; Armentano și colab. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber și colab. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry și colab. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. SUA 89:7640-7644; Kay și colab. (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai și colab. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. SUA 89:10892-10895; Hwu și colab. (1993) J. Immunol 150:4104-4115; Brevetul S.U.A. Nr. 4.868.116; Brevetul S.U.A. Nr. 4.980.286; Cererea PCT WO 89/07136; Cererea PCT WO 89/02468; PCT Cererea WO 89/05345; și cererea PCT WO 92/07573).

Sursele adecvate pentru obținerea de secvențe retrovirale (adică atât lentivirale, cât și non-lentivirale) pentru utilizare în formarea vectorilor includ, de exemplu, ARN genomic și ADNc disponibile din surse disponibile comercial, incluzând Colecția de Cultură de Tip (ATCC), Rockville, Md. Secvențele pot fi de asemenea sintetizate chimic.

Pentru exprimarea unui BCMA CAR, vectorul poate fi introdus într-o celulă gazdă pentru a permite exprimarea polipeptidei în celula gazdă. Vectorii de expresie pot conține o varietate de elemente pentru controlul expresiei, incluzând, fără limitare, secvențe de promotor, secvențe de inițiere a transcripției, secvențe amplificatoare, markeri selectabili și secvențe semnal. Aceste elemente pot fi selectate după cum este adecvat de către o persoană cu calificare obișnuită în domeniu, așa cum este descris mai sus. De exemplu, secvențele de promotor pot fi selectate pentru a promova transcripția polinucleotidei în vector. Secvențele de promotor adecvate includ, fără limitare, promotorul T7, promotorul T3, promotorul SP6, promotorul beta-actină, promotorul EF1a, promotorul CMV și promotorul SV40. Secvențele amplificatoare pot fi selectate pentru a spori transcripția polinucleotidei. Markerii selectabili pot fi selectați pentru a permite selecția celulelor gazdă inserate cu vectorul dintre cele care nu sunt, de exemplu, markerii selectabili pot fi gene care conferă rezistență la antibiotice. Secvențele semnal pot fi selectate pentru a permite polipeptidei exprimate să fie transportată în afara celulei gazdă.

Pentru clonarea polinucleotidei, vectorul poate fi introdus într-o celulă gazdă (o celulă gazdă izolată) pentru a permite replicarea vectorului însuși și astfel amplifica copiile polinucleotidei conținute în acesta. Vectorii de clonare pot conține componente de secvență includ în general, fără limitare, o origine a replicării, secvențe promotor, secvențe de inițiere a transcripției, secvențe amplificatoare și markeri selectabili. Aceste elemente pot fi selectate după caz de către o persoană de specialitate în domeniu. De exemplu, originea replicării poate fi selectată pentru a promova replicarea autonomă a vectorului în celula gazdă.

În anumite exemple de realizare, prezenta invenție furnizează celule gazdă izolate care conțin vectorii furnizați aici. Celulele gazdă care conțin vectorul pot fi utile în exprimarea sau clonarea polinucleotidei conținute în vector. Celulele gazdă adecvate pot include, fără limitare, celule procariote, celule fungice, celule de drojdie sau celule eucariote superioare, cum ar fi celulele de mamifere. Celulele procariote adecvate pentru acest scop includ, fără limitare, eubacterii, cum ar fi organisme Gram negative sau Gram pozitive, de exemplu, Enterobactehaceae cum ar fi *Escherichia*, de exemplu, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, de exemplu, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, de exemplu, *Serratia marcescans* și *Shigella*, precum și *Bacili* precum *B. subtilis* și *B. licheniformis*, *Pseudomonas* cum ar fi *P. aeruginosa* și *Streptomyces*.

CAR-urile prezentei invenții sunt introduse într-o celulă gazdă utilizând tehnici de transfecție și/sau transducție cunoscute în domeniu. Așa cum sunt utilizați aici, termenii „transfecție” și „transducție”, se referă la procesele prin care o secvență exogenă de acid nucleic este introdusă într-o celulă gazdă. Acidul nucleic poate fi integrat în ADN-ul celulei gazdă sau poate fi menținut extracromozomial. Acidul nucleic poate fi menținut tranzitoriu sau poate fi stabil introdus. Transfecția poate fi realizată printr-o varietate de mijloace cunoscute în domeniu, incluzând, dar fără a se limita la, co-precipitarea fosfat de calciu-ADN, transfecția mediată de DEAE-dextran, transfecția mediată de polibrenă, electroporarea, microinjecția, fuziunea lipozomilor, lipofecția, fuziunea protoplastului, infecție retrovirală și biolistică. Transducția se referă la livrarea unei gene (gene) folosind un vector viral sau retroviral prin intermediul infecției virale mai degrabă decât prin transfecție. În anumite variante de realizare, vectorii retrovirali sunt transduși prin ambalarea vectorilor în virioni înainte de contactul cu o

celulă. De exemplu, un acid nucleic care codifică un BCMA CAR purtat de un vector retroviral poate fi transdus într-o celulă prin infecție și integrare pro virus.

Așa cum este utilizat aici, termenul "modificat genetic" sau "modificat genetic" se referă la adăugarea de material genetic suplimentar sub formă de ADN sau ARN în materialul genetic total dintr-o celulă. Sunt utilizați interschimbabil termenii „celule modificate genetic”, „celule modificate” și „celule redirecționate”.

În special, CAR din prezenta invenție este introdusă și exprimată în celule efectoare imune astfel încât să le redirecționeze specificitatea către un antigen țintă de interes, de exemplu, o plasmocelulă malignă, de ex. mielom multiplu.

Prezenta invenție furnizează metode de producere a celulelor efectoare imune care exprimă CAR al invenției. Într-o variantă de realizare, metoda cuprinde transfectarea sau transducerea celulelor efectoare imune izolate de la un subiect, cum ar fi un subiect care are o celulă tumorală care exprimă BCMA, astfel încât celulele efectoare imune să exprime unul sau mai multe CAR al invenției. În anumite variante de realizare, celulele efectoare imune sunt izolate de la un individ și modificate genetic fără manipulare suplimentară *in vitro*. Astfel de celule pot fi apoi readministrate direct individului. În alte variante de realizare, celulele efectoare imune sunt mai întâi activate și stimulate să prolifereze *in vitro* înainte de a fi modificate genetic pentru a exprima un CAR. În această privință, celulele efectoare imune pot fi cultivate înainte sau după ce au fost modificate genetic (adică transduse sau transfectate pentru a exprima un CAR al invenției).

Înainte de manipularea *in vitro* sau modificarea genetică a celulelor efectoare imune descrise aici, sursa de celule poate fi obținută de la un subiect. În special, celulele efectoare imune pentru utilizare cu CAR-urile descrise aici cuprind celule T. Celulele T pot fi obținute dintr-o serie de surse, inclusiv celule mononucleare din sângele periferic, măduvă osoasă, țesut ganglionilor limfatici, sânge din cordonul ombilical, problema timusului, țesut dintr-un loc de infecție, ascită, revărsat pleural, țesut splinei și tumori. În anumite exemple de realizare, celula T poate fi obținută dintr-o unitate de sânge colectată de la subiect utilizând orice număr de tehnici cunoscute persoanei de specialitate, cum ar fi separarea FICOLL. Într-o variantă de realizare, celulele din sângele circulant al unui individ sunt obținute prin afereză. Produsul de afereză conține în mod obișnuit limfocite, inclusiv celule T, monocite, granulocite, celule B, alte globule albe nucleate, globule roșii și trombocite. Într-o variantă de realizare, celulele colectate prin afereză pot fi spălate pentru a îndepărta fracția de plasmă și pentru a plasa celulele într-un tampon sau mediu adecvat pentru procesarea ulterioară. Într-o variantă de realizare a invenției, celulele sunt spălate cu PBS. Într-o variantă de realizare alternativă, soluția spălată are lipsă de calciu și poate avea lipsă de magneziu sau poate lipsi mulți, dacă nu toți, cationi divalenți. După cum ar fi apreciat de către cei cu calificare obișnuită în domeniu, o etapă de spălare poate fi realizată prin metode cunoscute de cei din domeniu, cum ar fi prin utilizarea unei centrifuge semiautomatizate. După spălare, celulele pot fi resuspendate într-o varietate de soluții tampon biocompatibile sau altă soluție salină cu sau fără tampon. În anumite exemple de realizare, componentele nedorite ale probei de afereză pot fi îndepărtate în mediul de cultură resuspendat direct în celulă.

În anumite variante de realizare, celulele T sunt izolate din celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC) prin lizarea celulelor roșii din sânge și epuizarea monocitelor, de exemplu, prin centrifugare printr-un gradient PERCOLL™. O subpopulație specifică de celule T, cum ar fi celulele T CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ și CD45RO+, poate fi izolată suplimentar prin tehnici de selecție pozitive sau negative. De exemplu, îmbogățirea unei populații de celule T prin selecție negativă poate fi realizat cu o combinație de anticorpi direcționați către markeri de suprafață unici pentru celulele selectate negativ. O metodă de utilizare aici este sortarea și/sau selecția celulelor prin imunoaderență magnetică negativă sau citometrie în flux care utilizează un cocktail de anticorpi monoclonali direcționați către markerii de suprafață celulară prezenți pe celulele selectate negativ. De exemplu, pentru a îmbogăți celulele CD4+ prin selecție negativă, un cocktail de anticorpi monoclonali include de obicei anticorpi la CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR și CD8. Citometria în flux și sortarea celulelor pot fi, de asemenea, utilizate pentru a izola populațiile de celule de interes pentru utilizare în prezenta invenție.

PBMC-urile pot fi utilizate direct pentru modificarea genetică cu CAR-urile folosind metodele descrise aici. În anumite variante de realizare, după izolarea PBMC, limfocitele T sunt izolate în continuare și în anumite realizări, atât limfocitele T citotoxice, cât și limfocitele T helper pot fi sortate în subpopulații de celule T naive, de memorie și efectoare fie înainte, fie după modificarea genetică și/sau expansiunea. Celulele CD8+ pot fi obținute prin utilizarea metodelor standard. În unele variante de realizare, celulele CD8+ sunt sortate în continuare în celule naive, de memorie centrală și efectoare prin identificarea antigenelor de suprafață celulară care sunt asociate cu fiecare dintre acele tipuri de celule CD8+. În exemple de realizare, celulele T de memorie sunt prezente atât în subseturile CD62L+ cât și în subseturile CD62L- ale limfocitelor din sângele periferic CD8+. PBMC sunt sortate în fracții CD62L-

CD8+ și CD62L+CD8+ după colorare cu anticorpi anti-CD8 și anti-CD62L. În unele realizări, expresia markerilor fenotipici ai TCM memoriei centrale includ CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 și CD127 și sunt negative pentru granzima B. În unele realizări, celulele T de memorie centrală sunt celule T CD45RO+, CD62L+, CD8+. În unele realizări, celulele T efectoare sunt negative pentru CD62L, CCR7, CD28 și CD127 și pozitive pentru granzima B și perforină. În unele realizări, limfocitele T CD8+ naive sunt caracterizate prin exprimarea markerilor fenotipici ai celulelor T naive incluzând CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 și CD45RA.

În anumite realizări, celulele T CD4+ sunt sortate în continuare în subpopulații. De exemplu, celulele CD4+ T helper pot fi sortate în celule naive, de memorie centrală și efectoare prin identificarea populațiilor de celule care au antigeni de suprafață celulară. Limfocitele CD4+ pot fi obținute prin metode standard. În unele realizări, limfocitele T CD4+ naive sunt CD45RO-, CD45RA+, Celulă T CD62L+CD4+. În unele variante de realizare, celulele CD4+ de memorie centrală sunt pozitive pentru CD62L și pozitive pentru CD45RO. În unele realizări, celulele efectoare CD4+ sunt CD62L și CD45RO negative.

Celulele efectoare imune, cum ar fi celulele T, pot fi modificate genetic după izolare folosind metode cunoscute, sau celulele efectoare imune pot fi activate și extinse (sau diferențiate în cazul progenitorilor) *in vitro* înainte de a fi modificate genetic. Într-o altă variantă de realizare, celulele efectoare imune, cum ar fi celulele T, sunt modificate genetic cu receptorii de antigen himeric descriși aici (de exemplu, transduși cu un vector viral care cuprinde un acid nucleic care codifică un CAR) și apoi sunt activate și extinse *in vitro*. Metodele pentru activarea și extinderea celulelor T sunt cunoscute în domeniu și sunt descrise, de exemplu, în brevetul U.S. Nr. 6,905,874; Brevetul US Nr. 6,867,041; Brevetul US Nr. 6,797,514; W02012079000. În general, astfel de metode includ punerea în contact a PBMC sau a celulelor T izolate cu un agent stimulator și un agent costimulator, cum ar fi anticorpi anti-CD3 și anti-CD28, în general atașați la o perla sau la altă suprafață, într-un mediu de cultură cu citokine adecvate, cum ar fi IL-2. Anticorpii anti-CD3 și anti-CD28 atașați la aceeași granulă servesc ca o celulă prezentatoare de antigen „surogat” (APC). În alte variante de realizare, celulele T pot fi activate și stimulate să prolifereze cu celule alimentatoare și cu anticorpi și citokine adecvați utilizând metode precum cele descrise în brevetul U.S. Nr. 6,040,177; Brevetul US Nr. 5,827,642; și WO2012129514.

Invenția furnizează o populație de celule efectoare imune modificate pentru tratamentul unui pacient care are o malignitate cauzată de o tumoră care exprimă BCMA, de exemplu, mielom multiplu, celulele efectoare imune modificate cuprinzând un CAR BCMA al invenției.

Celulele efectoare imune care exprimă CAR preparate așa cum este descris aici pot fi utilizate în metode și compoziții pentru imunoterapie adoptivă în conformitate cu tehnici cunoscute, sau variații ale acestora care vor fi evidente pentru cei de specialitate în domeniu pe baza prezentei dezvăluiri. A se vedea, de exemplu, Publicația cererii de brevet US nr. 2003/0170238 pentru Gruenberg și colab; vezi, de asemenea, brevetul U.S. 4,690,915 al lui Rosenberg.

În unele exemple de realizare, celulele sunt formulate prin recoltarea lor din mediul lor de cultură, apoi spălarea și concentrarea celulelor într-un mediu și un sistem container adecvat pentru administrare (un purtător „acceptabil farmaceutic”) într-o cantitate eficientă pentru tratament. Mediul de perfuzie adecvat poate fi orice formulare de mediu izotonic, în mod obișnuit ser fiziologic normal, Normosol R (Abbott) sau Plasma-Lyte A (Baxter), dar poate fi utilizată și 5% dextroză în apă sau lactat Ringer. Mediul de perfuzie poate fi suplimentat cu albumină serică umană.

O cantitate eficientă de celule din compoziție este de cel puțin 2 celule (de exemplu, cel puțin 1 celulă T CD8+ cu memorie centrală și cel puțin 1 subset de celule T helper CD4+) sau este mai de obicei mai mare de 10^2 celule și până la 10^6 până la și include 10^8 sau 10^9 celule și poate fi mai mult de 10^{10} celule. Numărul de celule va depinde de utilizarea finală pentru care este destinată compoziția, la fel ca și tipul de celule incluse în aceasta.

Celulele pot fi autologe sau heterologe pentru pacientul supus terapiei. Dacă se dorește, tratamentul poate include, de asemenea, administrarea de mitogeni (de exemplu, PHA) sau limfokine, citokine și/sau chemokine (de exemplu, IFN-g, IL-2, IL-12, TNF- α , IL-18 și TNF- β , GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α , etc.) așa cum este descris aici pentru a îmbunătăți inducerea răspunsului imun.

Populațiile de celule efectoare imune care exprimă CAR ale prezentei invenții pot fi administrate fie singure, fie ca compoziție farmaceutică în combinație cu diluanți și/sau cu alte componente cum ar fi IL-2 sau alte citokine sau populații celulare. Pe scurt, compozițiile farmaceutice ale prezentei invenții pot cuprinde o populație de celule efectoare imune care exprimă CAR, cum ar fi celulele T, al invenției, în combinație cu unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți acceptabili farmaceutic sau fiziologic. Astfel de compoziții pot cuprinde soluții tampon cum ar fi soluție salină tamponată neutră, soluție salină tamponată cu fosfat și altele asemenea; carbohidrați cum ar fi glucoză, manoză, zaharoză sau dextransi,

manitol; proteine; polipeptide sau aminoacizi cum ar fi glicina; antioxidanți; agenți de chelare cum ar fi EDTA sau glutation; adjuvanți (de exemplu, hidroxid de aluminiu); și conservanți. Compozițiile prezentei invenții sunt de preferință formulate pentru administrare intravenoasă.

5 Răspunsul imun antitumoral indus la un subiect prin administrarea celulelor T care exprimă CAR descrie aici folosind metodele descrise aici, sau alte metode cunoscute în domeniu, poate include răspunsuri imune celulare mediate de celule T citotoxice capabile să omoare celulele infectate, T
10 reglatoare, celulele și răspunsurile celulelor T helper. Răspunsurile imune umorale, mediate în primul rând de celulele T helper capabile să activeze celulele B, conducând astfel la producerea de anticorpi, pot fi, de asemenea, induse. O varietate de tehnici pot fi utilizate pentru analiza tipului de răspunsuri imune
15 induse de compozițiile din prezenta invenție, care sunt bine descrise în domeniu; de exemplu, Current Protocols in Immunology, editat de: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

Astfel, prezenta invenție furnizează metode de tratare a unui individ diagnosticat cu sau
20 suspectat de a avea sau de risc de a dezvolta o malignitate hematopoietică caracterizată parțial prin acumularea anormală de celule plasmatiche producătoare de imunoglobuline în măduva osoasă, cum ar fi în mielomul multiplu, cuprinzând administrarea individului a unei cantități eficiente terapeutic din celulele efectoare imune care exprimă CAR.

Într-o variantă de realizare, invenția se referă la un receptor al antigenului himeric al invenției
25 pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui subiect diagnosticat cu un cancer care exprimă BCMA cuprinzând îndepărtarea celulelor efectoare imune de la un subiect diagnosticat cu un cancer care exprimă BCMA, modificarea genetică a respectivelor celule efectoare imune cu un vector care cuprinde un acid nucleic care codifică un receptor de antigen himeric al prezentei invenții, producând astfel o populație de celule efectoare imune modificate și administrând populația de celule efectoare imune modificate
30 aceluiși subiect. Într-o variantă de realizare, celulele efectoare imune cuprind celule T.

25 Metodele de administrare a compozițiilor celulare descrise aici includ orice metodă care este eficientă pentru a avea ca rezultat reintroducerea celulelor efectoare imune modificate genetic ex vivo care fie exprimă direct un CAR al invenției la subiect, fie la reintroducerea progenitorilor modificați genetic ai efectorului imun, celule care la introducerea într-un subiect se diferențiază în celule efectoare imune mature care exprimă CAR. O metodă cuprinde transducerea celulelor T din sângele periferic ex vivo cu un construct de acid nucleic în conformitate cu invenția și returnarea celulelor transduse în subiect.

Proprietăți de legare ale receptorilor de antigen himeric și anticorpilor corespunzători

Așa cum este utilizat aici, termenul "legare" în contextul legării unui receptor de antigen himeric sau a unui anticorp corespunzător la oricare, de exemplu, un antigen predeterminat, cum ar fi o proteină
35 de suprafață celulară sau un fragment al acesteia, se referă în mod obișnuit la o interacțiune sau asociere, între cel puțin două entități sau structuri moleculare, cum ar fi o interacțiune a domeniului de legare a antigenului.

De exemplu, afinitatea de legare corespunde în mod obișnuit unei valori KD de aproximativ 107M sau mai puțin, cum ar fi aproximativ 10-8M sau mai puțin, cum ar fi aproximativ 10-9M sau mai puțin atunci când este determinată, de exemplu, de tehnologia rezonanței plasmonilor de suprafață (SPR) într-un BIAcore 3000 care utilizează antigenul ca ligand și anticorpul sau receptorul de antigen himeric ca analit (sau antiligand). Strategiile de legare pe bază de celule, cum ar fi testele de legare de sortare a celulelor activate cu fluorescent (FACS), sunt de asemenea utilizate în mod obișnuit, iar datele FACS se corelează bine cu alte metode, cum ar fi legarea competiției radioligand și SPR (Benedict, CA, J Immunol Methods). 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA, et al. J Immunol Methods. 2005, 302(1-2):68-77).

În consecință, un receptor de antigen himeric sau un anticorp corespunzător al invenției se leagă la antigenul predeterminat sau la molecula de suprafață celulară (receptor) având o afinitate corespunzătoare unei valori K_D care este de cel puțin zece ori mai mică decât afinitatea sa pentru legarea la un antigen nespecific. (de exemplu, BSA, cazeină). Conform prezentei invenții, afinitatea unui receptor de antigen himeric sau a unui anticorp corespunzător cu o valoare K_D care este egală cu sau mai mică de zece ori mai mică decât un antigen nespecific poate fi considerată legare nedetectabilă.

Termenul " K_D " (M) se referă la constanta de echilibru de disociere a unei interacțiuni particulare cu domeniul de legare a antigenului sau constanta de echilibru de disociere a unui anticorp corespunzător la un antigen. Există o relație inversă între K_D și afinitatea de legare, prin urmare, cu cât valoarea K_D este
55 mai mică, cu atât este mai mare, adică mai puternică, afinitatea. Astfel, termenii „afinitate mai mare” sau „afinitate mai puternică” se referă la o capacitate mai mare de a forma o interacțiune și, prin urmare, o valoare K_D mai mică și, invers, termenii „afinitate mai scăzută” sau „afinitate mai slabă” se referă la o capacitate mai mică de a forma o interacțiune, și prin urmare o valoare K_D mai mare. În unele circumstanțe, o afinitate mai mare de legare (sau K_D) a unei anumite molecule (de exemplu, un receptor

de antigen himeric sau un anticorp corespunzător) la molecula sa parteneră interactivă (de exemplu, antigenul X) în comparație cu afinitatea de legare a moleculei (de exemplu, himeric). receptorul de antigen sau anticorpul corespunzător) la o altă moleculă parteneră interactivă (de exemplu, antigenul Y) poate fi exprimat ca un raport de legare determinat prin împărțirea valorii K_D mai mare (afinitate mai mică sau mai slabă) la K_D mai mică (afinitate mai mare sau mai puternică), de exemplu, exprimată ca afinitate de legare de 5 ori sau de 10 ori mai mare, după caz.

Termenul " k_d " (sec⁻¹ sau 1/s) se referă la constanta vitezei de disociere a unui anumit domeniu de legare a antigenului interacțiunea domeniu:antigen sau la constanta vitezei de disociere a unui receptor de antigen himeric sau a unui anticorp corespunzător. Valoarea menționată mai este denumită și valoarea k_{off} .

Termenul " k_a " (M⁻¹ x sec⁻¹ sau 1/M) se referă la constanta vitezei de asociere a unui anumit domeniu de legare a antigenului interacțiunea domeniu:antigen sau constanta vitezei de asociere a unui receptor de antigen himeric sau a unui anticorp corespunzător.

Termenul " K_A " (M⁻¹ sau 1/M) se referă la constanta de echilibru de asociere a unui anumit domeniu de legare antigen:interacțiunea antigen sau constanta de echilibru de asociere a unui receptor de antigen himeric sau a unui anticorp corespunzător. Constanta de echilibru de asociere se obține prin împărțirea k_a la k_d .

Termenul „EC50” sau „EC₅₀” se referă la jumătatea concentrației efective maxime, care include concentrația unui receptor de antigen himeric care induce un răspuns la jumătatea distanței dintre valoarea de bază și maximă după un timp de expunere specificat. EC₅₀ reprezintă în esență concentrația unui receptor de antigen himeric unde se observă 50% din efectul său maxim. În anumite exemple de realizare, valoarea EC₅₀ este egală cu concentrația unui receptor himeric de antigen sau a unui anticorp corespunzător conform invenției care dă legare jumătate maximă la celulele care exprimă un antigen (de exemplu, un antigen asociat tumorii, cum ar fi BCMA), așa cum este determinat de de exemplu. un test de legare FACS. Astfel, se observă o legare redusă sau mai slabă cu o EC₅₀ crescută sau jumătate din valoarea concentrației efective maxime.

Într-o variantă de realizare, legare scăzută poate fi definită ca un receptor de antigen himeric EC₅₀ crescut sau o concentrație de anticorp corespunzătoare care permite legarea la jumătatea cantității maxime de celule țintă.

Variante de secvență ale receptorilor de antigen himeric

Receptorii de antigen himeric sau prezenta prezenta dezvăluire pot cuprinde una sau mai multe substituții de aminoacizi, inserții și/sau deleții în cadrul și/sau regiunile CDR ale domeniilor variabile ale lanțului greu și ușor în comparație cu secvențele germinale corespunzătoare din care domeniile de legare ale antigenului individual al anticorpilor corespunzători au fost derivate. Astfel de mutații pot fi constatate cu ușurință prin compararea secvențelor de aminoacizi dezvăluite aici cu secvențele liniei germinale disponibile, de exemplu, din bazele de date publice de secvențe de anticorpi. Receptorii de antigen himeric ai prezentei invenții pot cuprinde domenii de legare la antigen care sunt derivate din oricare dintre secvențele de aminoacizi CDR sau regiuni variabile exemplificative descrise aici, în care unul sau mai mulți aminoacizi dintr-unul sau mai multe regiuni cadru și/sau regiuni CDR sunt mutante. la restul (reziduurile) corespunzătoare din secvența de linie germinală din care a fost derivat anticorpul corespunzător sau la restul (reziduurile) corespunzătoare ale altei secvențe de linie germinală umană sau la o substituție conservativă de aminoacizi a reziduurilor de linie germinală corespunzătoare (cum ar fi modificările de secvență sunt denumite aici în mod colectiv „mutații ale liniei germinale”). O persoană cu calificare obișnuită în domeniu, începând cu secvențele de regiune variabilă a lanțului greu și ușor descrise aici, poate produce cu ușurință numeroși anticorpi care cuprind una sau mai multe mutații individuale ale liniei germinale sau combinații ale acestora. în anumite variante de realizare, toate resturile cadru și/sau CDR din domeniile V_H și/sau V_L sunt mutate înapoi la resturile găsite în secvența originală a liniei germinale din care a fost derivat inițial domeniul de legare a antigenului. În alte cazuri, numai anumite reziduuri sunt mutate înapoi la secvența originală a liniei germinale, de exemplu, numai resturile mutante găsite în primii 8 aminoacizi ai FR1 sau în ultimii 8 aminoacizi ai FR4, sau numai resturile mutante găsite în CDR1, CDR2 sau CDR3. În alte cazuri, unul sau mai multe dintre resturile cadru și/sau CDR sunt mutate în restul (reziduurile) corespunzătoare ale unei secvențe de linie germinală diferită (adică, o secvență de linie germinală care este diferită de secvența de linie germinală din care domeniul de legare antigenul a fost derivat inițial). În plus, domeniile de legare la antigen pot conține orice combinație de două sau mai multe mutații ale liniei germinale în cadrul regiunilor cadru și/sau CDR, de exemplu, în care anumite resturi individuale sunt mutate la restul corespunzător al unei anumite secvențe de linie germinală, în timp ce anumite alte resturi care diferă de secvența originală a liniei germinale sunt menținute sau sunt mutate la reziduuul corespunzător al unei secvențe de linie germinală diferită.

Caracteristicile biologice ale receptorilor de antigen himeric și anticorpilor corespunzători

Prezenta dezvoltare include receptori de antigen himeric cu domenii de legare la antigen derivate din anticorpi care leagă BCMA uman cu afinitate mare (de exemplu, valori K_D nanomolare sau subnanomolare).

5 Conform anumitor variante de realizare, prezenta invenție include receptori de antigen himeric cu domenii de legare la antigen derivate din anticorpi corespunzători care leagă BCMA uman (de exemplu, la 25°C) cu un K_D mai mic de aproximativ 5 nM măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață. În anumite realizări, anticorpii corespunzători leagă BCMA cu un K_D mai mic de aproximativ 20 nM, mai puțin de aproximativ 10 nM, mai puțin de aproximativ 8 nM, mai puțin de aproximativ 7 nM, 10 mai puțin de aproximativ 6 nM, mai puțin de aproximativ 5 nM, mai puțin de aproximativ 5 nM, aproximativ 4 nM, mai puțin de aproximativ 3 nM, mai puțin de aproximativ 2 nM, mai puțin de aproximativ 1 nM, mai puțin de aproximativ 800 pM, mai puțin de aproximativ 700 pM, mai puțin de aproximativ 500 pM, mai puțin de aproximativ 400 pM, mai puțin de aproximativ 300 pM, mai puțin de aproximativ 200 pM, mai puțin de aproximativ 100 pM, mai puțin de aproximativ 50 pM sau mai puțin de 15 aproximativ 25 pM, măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață.

Prezenta invenție include, de asemenea, receptori de antigen himeric cu domenii de legare la antigen derivate din anticorpi corespunzători care leagă BCMA cu un timp de înjumătățire disociativ ($t_{1/2}$) mai mare de aproximativ 10 minute sau mai mare de aproximativ 125 de minute, măsurat prin rezonanța plasmonului de suprafață la 25°C. În anumite exemple de realizare, anticorpii corespunzători leagă 20 BCMA cu un $t_{1/2}$ mai mare de aproximativ 3 minute, mai mare de aproximativ 4 minute, mai mare de aproximativ 10 minute, mai mare de aproximativ 20 de minute, mai mare de aproximativ 30 de minute, mai mare de aproximativ 40 de minute, mai mare, mai mult de aproximativ 50 de minute, mai mare de aproximativ 60 de minute, mai mare de aproximativ 70 de minute, mai mare de aproximativ 80 de minute, mai mare de aproximativ 90 de minute, mai mare de aproximativ 100 de minute, mai mare de 25 aproximativ 110 minute sau mai mare de aproximativ 120 de minute, după cum este măsurat prin rezonanță plasmonică de suprafață la 25°C.

Prezenta dezvoltare include, de asemenea, receptori de antigen himeric cu domenii de legare la antigen derivate din anticorpi corespunzători care se leagă în mod specific la liniile celulare umane care exprimă BCMA endogen (de exemplu, NCI-H929, MOLP-8 sau OMP-2), așa cum este determinat de un 30 test de legare FACS.

Prezenta dezvoltare include, de asemenea, celule modificate care exprimă receptori de antigen himeric specifici BCMA care (i) sunt activați de celulele care exprimă BCMA și/sau (ii) prezintă 35 inhibarea creșterii tumorii la șoarecii imunocompromiși purtători de xenogrefe umane de mielom multiplu.

35 Pregătirea domeniilor de legare a antigenului

Domeniile de legare la antigen ale receptorilor de antigen himeric din prezenta invenție, care sunt specifice pentru antigene particulare (de exemplu, BCMA), pot fi preparate prin orice tehnologie de 40 generare a anticorpilor cunoscută în domeniu. În anumite variante de realizare, una sau mai multe dintre componentele individuale (de exemplu, lanțuri grele și ușoare) ale anticorpilor corespunzători invenției sunt derivate din anticorpi himeric, umanizați sau complet umani. Metodele pentru producerea unor astfel de anticorpi sunt bine cunoscute în domeniu. De exemplu, unul sau mai multe dintre lanțurile grele și/sau 45 ușoare pot fi preparate folosind tehnologia VELOCIMMUNE™. Folosind tehnologia VELOCIMMUNE™ (sau orice altă tehnologie de generare a anticorpilor umani), anticorpii himeric de mare afinitate la un anumit antigen (de exemplu, BCMA) sunt izolați inițial având o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece. Anticorpii sunt caracterizați și selectați pentru caracteristicile dorite, inclusiv afinitatea, selectivitatea, epitopul etc. După cum s-a discutat aici, aceste regiuni variabile umane (sau CDR-uri) pot fi apoi încorporate în domeniile de legare la antigen ale receptorilor de antigen himeric.

50 Polinucleotide și Vectori

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la polinucleotide și vectori care codifică receptorii de antigen himeric discutați aici.

În diverse exemple de realizare, polinucleotida poate cuprinde o casetă de expresie sau un vector de expresie (de exemplu, o plasmidă pentru introducerea într-o celulă gazdă bacteriană sau un vector 55 viral, cum ar fi un vector baculovirus pentru transfecția unei celule gazdă de insectă, sau o plasmidă sau un vector viral). cum ar fi un lentivirus pentru transfecția unei celule gazdă de mamifer).

În diferite aspecte, polinucleotidele și/sau vectorii cuprind o moleculă de acid nucleic cuprinzând secvența de nucleotide din SECV ID NR: 81, SECV ID NR: 83, SECV ID NR: 85, SECV ID NR: 87 sau SECV ID NR: 89. În diferite aspecte, polinucleotidele și/sau vectorii cuprind o secvență de nucleotide

care codifică secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 84, SECV ID NR: 86, SECV ID NR: 88 sau SECV ID NR: 90 . În diferite aspecte, polinucleotidele și/sau vectorii cuprind o secvență de nucleotide care codifică secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 97, SECV ID NR: 98, SECV ID NR: 99 sau SECV ID NR: 100.

5 **Metode de inginerie a celulelor imune care exprimă receptorii de antigen himeric**

Prezenta invenție cuprinde metode de preparare a celulelor imune pentru imunoterapie cuprinzând introducerea, *ex vivo*, în astfel de celule imune a polinucleotidelor sau vectorilor care codifică unul dintre receptorii de antigen himeric specifici BCMA descriși aici.

10 Prezenta invenție cuprinde, de asemenea, celule imune cuprinzând un vector polinucleotidic sau lentiviral care codifică unul dintre receptorii de antigen himeric specifici BCMA discutați aici. În unele exemple de realizare, aceste celule imune sunt utilizate pentru imunoterapie (de exemplu, tratamentul cancerului).

15 Prezenta invenție cuprinde, de asemenea, metode de modificare genetică a celulelor imune pentru a le face mai potrivite pentru transplantul alogen. Conform unui prim aspect, celula imună poate fi făcută alogenă, de exemplu, prin inactivarea a cel puțin unei gene care exprimă una sau mai multe componente ale receptorului celulei-T (TCR) așa cum este descris în WO 2013/176915, care poate fi combinată cu inactivarea unei gene care codifică sau reglează expresia proteinei HLA sau $\beta 2m$. În consecință, riscul de sindrom de greță versus gazdă și de respingere a grefei este semnificativ redus. Conform unui alt aspect al invenției, celulele imune pot fi manipulate în continuare pentru a le face mai active sau pentru a limita epuizarea, prin inactivarea genelor care codifică proteine care acționează ca „puncte de control imune” care acționează ca regulatori ai activării celulelor T, cum ar fi PD1 sau CTLA-4.

Celulele imune proiectate

25 Celulele imune cuprinzând un receptor de antigen himeric conform invenției (sau celule imune modificate) sunt un alt obiect al prezentei invenții. În unele cazuri, celula imună este o celulă efector imună. În unele cazuri, celula imunitară este o celulă T. În unele cazuri, celula imună este un limfocit T selectat dintre un limfocit T inflamator, un limfocit T citotoxic, un limfocit T reglator sau un limfocit T helper. În unele cazuri, celula imunitară este un limfocit T citotoxic CD8+.

30 În unele exemple de realizare, celula imună modificată este o celulă T umană care cuprinde un receptor de antigen himeric care cuprinde, de la capătul N-terminal la capătul C-terminal: (a) un domeniu de legare a ligandului extracelular care cuprinde un domeniu de fragment variabil cu lanț unic anti-BCMA (scFv) cuprinzând o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) și o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR); (b) o balama; (c) un domeniu transmembranar; și (d) un domeniu citoplasmatic care cuprinde un domeniu costimulator și un domeniu de semnalizare.

35 În unele realizări, domeniul scFv al celulei T umane modificate cuprinde o pereche de secvențe de aminoacizi LCVR/HCVR care cuprinde secvențele de aminoacizi ale SECV ID NR: 10/2, 26/18, 42/34, 58/50 sau 74/66. În unele cazuri, balama cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 97. În unele cazuri, domeniul transmembranar cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 98. În unele cazuri, domeniul costimulator este un domeniu costimulator 4-1 BB. În unele cazuri, domeniul costimulator 4-1 BB cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 99. În unele cazuri, domeniul de semnalizare este un domeniu de semnalizare CD3zeta. În unele cazuri, domeniul de semnalizare CD3zeta cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 100.

40 În diferite cazuri, celula T umană modificată cuprinde un receptor de antigen himeric care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 84, SECV ID NR: 86, SECV ID NR: 88 sau SECV ID NR: 90 .

Bioechivalenți

50 Prezenta invenție cuprinde receptori de antigen himeric și celule modificate care exprimă receptorii de antigen himeric, care au secvențe de aminoacizi care diferă de cele ale moleculelor exemplificative descrise aici, dar care păstrează capacitatea de a lega BCMA, de a activa celulele imune care exprimă receptorii de antigen himeric în prezența celulelor care exprimă BCMA sau suprimă creșterea sau proliferarea celulelor tumorale care exprimă BCMA. Astfel de molecule variate pot cuprinde una sau mai multe adăugiri, deleții sau substituții de aminoacizi în comparație cu secvența părinte, dar prezintă activitate biologică care este în esență echivalentă cu cea a moleculelor bispecifice de legare la antigen descrise.

55 De exemplu, două celule imune modificate care exprimă un receptor de antigen himeric al prezentei invenții sunt bioechivalente dacă nu există diferențe semnificative clinic în siguranța, puritatea și potența lor.

De exemplu, două celule imune modificate sunt bioechivalente dacă un pacient poate fi schimbat o dată sau de mai multe ori între produsul de referință și produsul biologic fără o creștere așteptată a

riscului de efecte adverse, inclusiv o schimbare semnificativă clinic a imunogenității sau o eficacitate redusă, în comparație cu terapia continuată fără o astfel de schimbare.

De exemplu, două celule imune modificate sunt bioechivalente dacă ambele acționează printr-un mecanism comun sau mecanisme de acțiune pentru starea sau condițiile de utilizare, în măsura în care astfel de mecanisme sunt cunoscute.

Bioechivalența poate fi demonstrată prin metode *in vivo* și *in vitro*. Măsurile de bioechivalență includ, de exemplu, (a) un test *in vivo* la oameni sau alte mamifere, în care concentrația celulei modificate este măsurată în sânge, plasmă, ser sau alt fluid biologic în funcție de timp; (b) un test *in vitro* care a fost corelat cu datele de biodisponibilitate umană *in vivo* și care previne în mod rezonabil pentru acestea; (c) un test *in vivo* pe oameni sau alte mamifere în care efectul farmacologic acut adecvat al celulei modificate (sau al țintei acesteia) este măsurat în funcție de timp; și (d) într-un studiu clinic bine controlat care stabilește siguranța, eficacitatea sau biodisponibilitatea sau bioechivalența unei celule modificate.

Variantele bioechivalente ale celulelor modificate exemplificative prezentate aici pot fi construite, de exemplu, prin efectuarea diferitelor substituții de resturi sau secvențe sau ștergerea resturilor sau secvențelor terminale sau interne care nu sunt necesare pentru activitatea biologică.

Selectivitatea speciilor și reactivitatea încrucișată a speciilor

Conform anumitor aspecte, sunt furnizate domenii de legare la antigen care se leagă la BCMA uman, dar nu la BCMA de la alte specii. Prezenta dezvăluire include, de asemenea, domenii de legare la antigen care se leagă la BCMA uman și la BCMA de la una sau mai multe specii non-umane.

Conform anumitor aspecte, sunt furnizate domenii de legare la antigen care se leagă la BCMA uman și se pot lega sau nu, după caz, la unul sau mai multe dintre șoarece, șobolan, cobai, hamster, gerbil, porc, pisică, câine, iepure, capră, oaie, vacă, cal, cămilă, cynomolgus, marmoset, rhesus sau cimpanzeu BCMA.

Activarea și extinderea celulelor imune proiectate

Indiferent dacă înainte sau după modificarea genetică a celulelor modificate (de exemplu, celulele T), chiar dacă celulele imune modificate genetic din prezenta invenție sunt activate și proliferază independent de mecanismele de legare la antigen, celulele imune, în special celulele T din prezenta invenție pot fi activate și extinse suplimentar, în general, utilizând metode descrise, de exemplu, în brevetul U.S.nr. 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; și Publicarea cererii de brevet SUA nr. 20060121005. Celulele T pot fi extinse *in vitro* sau *in vivo*.

În general, celulele T conform invenției sunt extinse prin contactul cu un agent care stimulează un complex CD3 TCR și o moleculă de costimulare pe suprafața celulelor T pentru a crea un semnal de activare pentru celula T. De exemplu, substanțe chimice precum ionoforul de calciu A23187, 12-miristatul 13-acetat de forbol (PMA) sau lectinele mitogenice precum fitohemaglutinina (PHA) pot fi utilizate pentru a crea un semnal de activare pentru celula T.

Ca exemple nelimitative, populațiile de celule T pot fi stimulate *in vitro*, cum ar fi prin contact cu un anticorp anti-CD3 sau cu un fragment de legare la antigen al acestuia sau cu un anticorp anti-CD2 imobilizat pe o suprafață sau prin contact cu un activator al proteinei kinazei C (de exemplu, briostatina) în combinație cu un ionofor de calciu. Pentru costimularea unei molecule accesorie de pe suprafața celulelor T, se folosește un ligand care leagă molecula accesorie. De exemplu, o populație de celule T poate fi contactată cu un anticorp anti-CD3 și un anticorp anti-CD28, în condiții adecvate pentru stimularea proliferării celulelor T. Condițiile adecvate pentru cultura de celule T includ un mediu adecvat (de exemplu, Minimal Essential Media sau RPMI Media 1640 sau, X-*vivo* 5, (Lonza)) care poate conține factori necesari pentru proliferare și viabilitate, inclusiv ser (de exemplu, fetal bovin sau uman). ser), interleukină-2 (IL-2), insulină, IFN-g, 1 L-4, 1 L-7, GM-CSF, IL-10, IL-2, 1 L-15, TGF β și TNF- α sau orice alți aditivi pentru creșterea celulelor cunoscute specialistului în domeniu. Alți aditivi pentru creșterea celulelor includ, dar nu sunt limitați la, surfactant, plasmanat și agenți reducători cum ar fi N-acetil-cisteină și 2-mercaptoetanoi. Mediile pot include RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 1 și X-Vivo 20, Optimizer, cu adăugare de aminoacizi, piruvat de sodiu și vitamine, fie fără ser sau suplimentat cu o cantitate adecvată de ser (sau plasmă) sau un set definit de hormoni și/sau o cantitate de citokină(e) suficientă pentru creșterea și expansiunea celulelor T. Antibioticele, de exemplu, penicilina și streptomocina, sunt incluse numai în culturile experimentale, nu în culturile de celule care urmează să fie perfuzate unui subiect. Celulele țintă sunt menținute în condițiile necesare pentru a susține creșterea, de exemplu, o temperatură adecvată (de exemplu, 37°C) și atmosferă (de exemplu, aer plus 5% O₂). Celulele T care au fost expuse la timpi variați de stimulare pot prezenta caracteristici diferite.

Într-un alt exemplu de realizare particular, celulele menționate pot fi extinse prin co-cultivare cu țesut sau celule. Respectivul celule pot fi, de asemenea, extinse *in vivo*, de exemplu în sângele subiectului după administrarea respectivei celule la subiect.

Aplicații terapeutice

Prezenta invenție include compoziții care cuprind o celulă modificată (de exemplu, o celulă T) care exprimă un receptor de antigen himeric al invenției și un vehicul acceptabil farmaceutic. În unele cazuri, celulele modificate formează un medicament, în special pentru imunoterapie. În unele cazuri, celulele modificate sunt utilizate pentru tratamentul cancerului (de exemplu, mielomul multiplu). În unele cazuri, celulele modificate sunt utilizate la fabricarea unui medicament pentru imunoterapie și/sau tratamentul unui cancer (de exemplu, un cancer care exprimă BCMA).

Prezenta invenție include metode care cuprind administrarea unui subiect care are nevoie de aceasta a unei compoziții terapeutice care cuprinde o celulă modificată (de exemplu, o celulă T) care exprimă un receptor de antigen himeric așa cum s-a discutat aici. Compoziția terapeutică poate cuprinde o celulă care exprimă orice receptor de antigen himeric așa cum este dezvoltat aici și un purtător, diluant sau vehicul acceptabil farmaceutic. Așa cum este utilizată aici, expresia „un subiect care are nevoie de aceasta” înseamnă un animal uman sau non-uman care prezintă unul sau mai multe simptome sau indicii de cancer (de exemplu, un subiect care exprimă o tumoră sau care suferă de oricare dintre cancerelor menționate aici), sau care altfel ar beneficia de o inhibare sau o reducere a activității BCMA sau o epuizare a celulelor BCMA+ (de exemplu, celule de mielom multiplu).

Celulele modificate conform prezentei invenții sunt utile, inter alia, pentru tratarea oricărei boli sau tulburări în care stimularea, activarea și/sau ținerea unui răspuns imun ar fi benefice. În particular, celulele modificate conform prezentei invenții pot fi utilizate pentru tratamentul, prevenirea și/sau ameliorarea oricărei boli sau tulburări asociate sau mediate de expresia sau activitatea BCMA sau proliferarea celulelor BCMA+. Celulele care exprimă BCMA care pot fi inhibitate sau distruse folosind celulele modificate conform invenției includ, de exemplu, celule de mielom multiplu.

Celulele modificate conform prezentei invenții pot fi utilizate pentru a trata o boală sau o tulburare asociată cu expresia BCMA, incluzând, de exemplu, un cancer care include mielom multiplu sau alte tipuri de cancer cu celule B sau celule plasmatică, cum ar fi macroglobulinemia Waldenstrom, limfomul Burkitt și limfomul difuz mare. Limfom cu celule B. În unele realizări, boala sau tulburarea care exprimă BCMA este boala Castleman, limfomul limfoplasmocitar, limfomul folicular, limfomul cu celule de manta, limfomul zonei marginale, limfomul Hodgkin, limfomul Non-Hodgkin sau leucemia limfocitară cronică. Conform anumitor realizări ale prezentei invenții, celulele modificate sunt utile pentru tratarea unui pacient afectat de mielom multiplu. Potrivit altor exemple de realizare conexe ale invenției, sunt furnizate metode care cuprind administrarea unei celule modificate așa cum este dezvoltată aici unui pacient care este afectat de mielom multiplu. Metodele analitice/diagnostic cunoscute în domeniu, cum ar fi scanarea tumorii, etc., pot fi utilizate pentru a stabili dacă un pacient prezintă mielom multiplu sau alt cancer de linie de celule B.

Prezenta invenție include, de asemenea, metode pentru tratarea cancerului rezidual la un subiect. Așa cum este utilizat aici, termenul "cancer rezidual" înseamnă existența sau persistența uneia sau mai multor celule canceroase la un subiect în urma tratamentului cu o terapie anticancer.

Conform anumitor aspecte, prezenta invenție furnizează metode pentru tratarea unei boli sau tulburări asociate cu expresia BCMA (de exemplu, mielom multiplu) cuprinzând administrarea unei populații de celule modificate descrise în altă parte aici la un subiect după ce subiectul a fost determinat că are mielom multiplu. De exemplu, prezenta invenție include metode pentru tratarea mielomului multiplu cuprinzând administrarea celulelor imune modificate la un pacient 1 zi, 2 zile, 3 zile, 4 zile, 5 zile, 6 zile, 1 săptămână, 2 săptămâni, 3 săptămâni sau 4 săptămâni, 2 luni, 4 luni, 6 luni, 8 luni, 1 an sau mai mult după ce subiectul a primit altă imunoterapie sau chimioterapie.

Tratamentele discutate aici pot fi ameliorative, curative sau profilactice. Tratamentele pot fi fie parte dintr-o imunoterapie autologă, fie parte dintr-un alogen imunoterapie. Prin autolog, se înțelege că celulele, linia celulară sau populația de celule utilizate pentru tratarea pacienților provin de la pacient sau de la un donator compatibil cu antigenul leucocitar uman (HLA). Prin alogenic se înțelege că celulele, linia celulară sau populația de celule utilizate pentru tratarea pacienților nu provin de la pacient, ci de la un donator.

Celulele care pot fi utilizate cu metodele dezvoltate sunt descrise aici. Tratamentele pot fi utilizate pentru a trata pacienții diagnosticați cu o afecțiune de cancer pre-malignă sau malignă caracterizată prin celule care exprimă BCMA, în special printr-o supraabundență de celule care exprimă BCMA. Astfel de condiții se găsesc în cancer, cum ar fi mielomul multiplu.

Tipurile de cancer care urmează să fie tratate cu celulele modificate conform invenției includ, dar nu se limitează la mielomul multiplu, macroglobulinemia Waldenstrom, limfomul Burkitt și limfomul difuz cu celule B mari, precum și alte tipuri de cancer cu celule B sau cu celule plasmatică. În unele exemple de realizare, celulele modificate pot fi utilizate pentru a trata o boală sau o tulburare care exprimă BCMA, cum ar fi boala Castleman, limfomul limfoplasmocitar, limfomul folicular, limfomul cu

celule de manta, limfomul zonei marginale, limfomul Hodgkin, limfomul non-Hodgkin sau limfomul cronic. leucemie.

Compozițiile și metodele prezentei invenții pot fi utilizate pentru a trata un subiect care a fost caracterizat ca având celule sau țesuturi care exprimă BCMA sau este suspectat că are celule sau țesuturi care exprimă BCMA. De exemplu, subiecții care beneficiază de tratamentul conform invenției includ subiecți cu mielom multiplu.

Administrarea celulelor sau populației de celule conform prezentei invenții poate fi efectuată în orice mod convenabil, inclusiv prin inhalare de aerosoli, injectare, ingestie, transfuzie, implantare sau transplant. Compozițiile descrise aici pot fi administrate unui pacient subcutanat, intradermic, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, prin injectare intravenoasă sau intralimfatică sau intraperitoneal. Într-o variantă de realizare, compozițiile celulare ale prezentei invenții sunt de preferință administrate prin injecție intravenoasă.

Administrarea celulelor sau a populației de celule poate consta în administrarea a 10^4 - 10^9 celule per kg greutate corporală, de preferință 10^5 până la 10^6 celule/kg greutate corporală incluzând toate valorile întregi ale numerelor de celule din acele intervale. Celulele sau populația de celule pot fi administrate în una sau mai multe doze. În unele exemple de realizare, cantitatea eficientă de celule este administrată ca o singură doză. În unele exemple de realizare, cantitatea eficientă de celule este administrată ca mai mult de o doză pe o perioadă de timp. Momentul de administrare este la aprecierea medicului director și depinde de starea clinică a pacientului. Celulele sau populația de celule pot fi obținute din orice sursă, cum ar fi o bancă de sânge sau un donator. În timp ce nevoile individuale variază, determinarea intervalelor de cantități eficiente dintr-un anumit tip de celulă pentru o anumită boală sau afecțiune se află în competența în domeniu. O cantitate eficientă înseamnă o cantitate care oferă un beneficiu terapeutic sau profilactic. Doza administrată va depinde de vârsta, sănătatea și greutatea primitivului, tipul de tratament concomitent, dacă este cazul, frecvența tratamentului și natura efectului dorit.

Într-o variantă de realizare, cantitatea eficientă de celule sau compoziția care cuprinde acele celule este administrată parenteral. Această administrare poate fi o administrare intravenoasă. În unele cazuri, administrarea se poate face direct prin injectare în interiorul unei tumori.

În anumite realizări ale prezentei invenții, celulele sunt administrate unui pacient împreună cu (de exemplu, înainte, simultan sau după) orice număr de modalități de tratament relevante, incluzând, dar fără a se limita la, tratamentul cu agenți cum ar fi terapia antivirală, cidofovir și interleukină-2, Citarabină (cunoscută și ca ARA-C) sau tratament cu natalizumab pentru pacienții cu SM sau tratamentul cu efaliztimab pentru pacienții cu psoriasis sau alte tratamente pentru pacienții cu LMP. În alte variante de realizare, celulele T ale invenției pot fi utilizate în combinație cu chimioterapie, radiații, agenți imunosupresori, cum ar fi ciclosporină, azatioprină, metotrexat, micofenolat și FK506, anticorpi sau alți agenți imunoablativi, cum ar fi CAM PATH, anticorpi anti-CD3 sau alte terapii cu anticorpi, citoxină, fludarabină, ciclosporină, FK506, rapamicin, acid micoplienolic, steroizi, FR901228, citochine, și iradiere.

Într-un alt exemplu de realizare, compozițiile celulare ale prezentei invenții sunt administrate unui pacient împreună cu (de exemplu, înainte, simultan sau după) transplant de măduvă osoasă, terapie ablativă cu celule T folosind fie agenți de chimioterapie, cum ar fi fludarabină, radiații cu fascicul extern. terapie (XRT), ciclofosfamidă sau anticorpi cum ar fi OKT3 sau CAM PATH, într-o altă variantă de realizare, compozițiile celulare din prezenta invenție sunt administrate după terapia ablativă cu celule B, cum ar fi agenți care reacționează cu CD20, de exemplu, Rituxan. De exemplu, într-un exemplu de realizare, subiecții pot fi supuși unui tratament standard cu chimioterapie în doză mare urmată de transplant de celule stem din sângele periferic. În anumite variante de realizare, după transplant, subiecții primesc o perfuzie din celulele imune expandate ale prezentei invenții. Într-o variantă suplimentară de realizare, celulele expandate sunt administrate înainte sau după intervenția chirurgicală. În anumite exemple de realizare, orice mijloc (de exemplu, chirurgie, chimioterapie sau radioterapie) poate fi utilizat pentru a reduce sarcina tumorală înainte de administrarea celulelor imune expandate conform prezentei invenții. Într-o variantă de realizare, reducerea sarcinii tumorale înainte de administrarea celulelor modificate conform invenției poate reduce potențialul pentru, sau poate preveni, sindromul de eliberare de citokine sau o furtună de citokine, un efect secundar care poate fi asociat cu terapia cu celule CAR T.

Terapii combinate

Prezenta invenție furnizează metode care cuprind administrarea celulelor modificate sau a unei populații de celule cuprinzând oricare dintre receptorii de antigen himeric descriși aici în combinație cu unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari. Exemple de agenți terapeutici suplimentari care pot fi combinați cu sau administrați în combinație cu celulele sau populația de celule din prezenta invenției includ, de exemplu, un agent antitumoral {de ex. agenți chimioterapeutici, inclusiv melfalan, vincristină (Oncovin), ciclofosfamidă (Cytosan), etoposidă (VP-16), doxorubicină (Adriamycin), doxorubicină

lipozomală (Doxii), obendamustina (Treanda) sau orice alții cunoscuți a fi eficienți în tratarea celulelor plasmatică tumoră la un subiect). în unele realizări, al doilea agent terapeutic cuprinde steroizi. în unele realizări, al doilea agent terapeutic cuprinde terapii țintite incluzând talidomidă, ienalidomidă și bortezumib, care sunt terapii aprobate pentru a trata pacienții nou diagnosticați. Lenalidomida, pomalidomida, bortezumib, carfilzomib, panobinostat, ixazomib, elotuzumab și daratumumab sunt exemple de al doilea agent terapeutic eficient pentru tratarea mielomului recurent. în anumite exemple de realizare, al doilea agent terapeutic este un regim care cuprinde radioterapie sau un transplant de celule stem. În anumite exemple de realizare, al doilea agent terapeutic poate fi un agent imunomodulator. în anumite realizări, al doilea agent terapeutic poate fi un inhibitor de proteazom, incluzând bortezumib (Velcade), carfilzomib (Kyprolis), ixazomib (Ninlaro). în anumite realizări, al doilea agent terapeutic poate fi un inhibitor al histonei deacetilazei, cum ar fi panobinostat (Farydak). În anumite exemple de realizare, al doilea agent terapeutic poate fi un anticorp monoclonal, un conjugat de medicament cu anticorpi, un anticorp bispecific conjugat la un agent anti-tumoral, un inhibitor de punct de control sau combinații ale acestora. Alți agenți care pot fi administrați în mod benefic în combinație cu moleculele de legare a antigenului din invenție includ inhibitori de citokine, inclusiv inhibitori de citokine cu molecule mici și anticorpi care se leagă la citokine cum ar fi IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 sau la receptorii lor respectivi. Compozițiile farmaceutice ale prezentei invenții (de exemplu, compozițiile farmaceutice care cuprind celule modificate sau populații de celule așa cum sunt dezvăluite aici) pot fi, de asemenea, administrate ca parte a unui regim terapeutic care cuprinde una sau mai multe combinații terapeutice selectate dintr-un anticorp monoclonal altul decât cele descrise aici, care poate interacționa cu un antigen diferit de pe suprafața celulei plasmatică, un anticorp bispecific, care are un braț care se leagă de un antigen de pe suprafața celulei tumorale și celălalt braț se leagă de un antigen de pe o celulă T, un conjugat de medicament cu anticorpi, a anticorp bispecific conjugat cu un agent anti-tumoral, un inhibitor al punctului de control, de exemplu, unul care vizează, PD-1 sau CTLA-4, sau combinații ale acestora. În anumite variante de realizare, inhibitorii punctului de control pot fi selectați dintre inhibitorii PD-1, cum ar fi pembrolizumab (Keytruda), nivolumab (Opdivo) sau cemiplimab (REGN2810). în anumite realizări, inhibitorii punctului de control pot fi selectați dintre inhibitorii PD-L1, cum ar fi atezolizumab (Tecentriq), avelumab (Bavencio) sau Durvalumab (Imfinzi)). în anumite realizări, inhibitorii punctului de control pot fi selectați dintre inhibitorii CTLA-4, cum ar fi ipilimumab (Yervoy).

Prezenta invenție include, de asemenea, combinații terapeutice care cuprind oricare dintre celulele modificate sau populațiile de celule menționate aici și un inhibitor al unuia sau mai multor dintre VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1 R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, uroplakină sau oricare dintre citokinele menționate mai sus, în care inhibitorul este un aptamer, o moleculă antisens, o ribozimă, un siARN, un pepticorp, un nanocorp sau un fragment de anticorp (de exemplu, fragment Fab; fragment F(ab')₂; fragment Fd; fragment Fv; scFv; fragment dAb; sau alte molecule modificate, cum ar fi diacorpi, triacorpi, tetracorpi, minicorpi și unități minime de recunoaștere). în unele exemple de realizare, celulele modificate sau populația de celule conform invenției pot fi, de asemenea, administrate ca parte a unui regim de tratament care include, de asemenea, tratament cu radiații și/sau chimioterapie convențională.

Componenta(e) activă(e) terapeutică suplimentară(e) pot fi administrate chiar înainte de, concomitent cu sau la scurt timp după administrarea celulelor modificate conform prezentei invenții; (în scopurile prezentei dezvăluiri, astfel de regimuri de administrare sunt considerate administrarea celulelor modificate „în combinație cu” o componentă suplimentară activă terapeutică).

Prezenta invenție include compoziții farmaceutice în care o celulă modificată sau o populație de celule conform prezentei invenții este co-formulată cu una sau mai multe dintre componentele suplimentare active terapeutică, așa cum este descris în altă parte aici.

Regimuri de administrare

Conform anumitor variante de realizare ale prezentei invenții, doze multiple de celule modificate pot fi administrate unui subiect pe o perioadă de timp definită. Metodele conform acestui aspect al invenției cuprind administrarea secvențială la un subiect de doze multiple de celule. Așa cum este utilizat aici, "administrarea secvențială" înseamnă că fiecare doză este administrată subiectului la un moment diferit de timp, de exemplu, în zile diferite separate printr-un interval predeterminat (de exemplu, ore, zile, săptămâni sau luni). Prezenta invenție include metode care cuprind administrarea secvențială la pacient a unei singure doze inițiale, urmată de una sau mai multe doze secundare și, opțional, urmată de una sau mai multe doze terțiare.

Termenii "doză inițială", "doze secundare" și "doze terțiare" se referă la secvența temporală de administrare a celulelor modificate conform invenției. Astfel, "doza inițială" este doza care este administrată la începutul regimului de tratament (denumită și "doză de bază"); "dozele secundare" sunt

dozele care sunt administrate după doza inițială; iar "dozele terțiare" sunt dozele care sunt administrate după dozele secundare. Dozele inițiale, secundare și terțiare pot conține toate aceleași cantități de celule modificate, dar în general pot diferi unele de altele în ceea ce privește frecvența administrării. În anumite exemple de realizare, totuși, cantitatea de celule modificate conținută în dozele inițiale, secundare și/sau terțiare variază una de la alta (de exemplu, ajustată în sus sau în jos după caz) în timpul tratamentului. În anumite realizări, două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4 sau 5) doze sunt administrate la începutul regimului de tratament ca „doze de încărcare” urmate de doze ulterioare care sunt administrate mai puțin frecvent (de exemplu, „doze de întreținere”).

Într-un exemplu de realizare a prezentei invenții, fiecare doză secundară și/sau terțiară este administrată de la 1 la 26 (de exemplu, 1, 1 ½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7), 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11 ½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20½, 19½, 20½, 19½, 20½, 20½, 20½, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ sau mai mult) săptămâni după doza imediat anterioară. Expresia "doza imediat anterioară", așa cum este utilizată aici, înseamnă, într-o secvență de administrări multiple, doza care este administrată unui pacient înainte de administrarea dozei imediat următoare în secvența fără doze intermediare.

Metodele conform acestui aspect al invenției pot cuprinde administrarea unui pacient a oricărui număr de doze secundare și/sau terțiare. De exemplu, în anumite variante de realizare, pacientului i se administrează doar o singură doză secundară. În alte variante de realizare, două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau mai multe) doze secundare sunt administrate pacientului. De asemenea, în anumite exemple de realizare, pacientului i se administrează doar o singură doză terțiară. În alte variante de realizare, două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau mai multe) doze terțiare sunt administrate pacientului.

În exemplele de realizare care implică doze secundare multiple, fiecare doză secundară poate fi administrată la aceeași frecvență ca și celelalte doze secundare. De exemplu, fiecare doză secundară poate fi administrată pacientului la 1 până la 2 săptămâni după doza imediat anterioară. În mod similar, în exemplele de realizare care implică mai multe doze terțiare, fiecare doză terțiară poate fi administrată la aceeași frecvență ca și celelalte doze terțiare. De exemplu, fiecare doză terțiară poate fi administrată pacientului la 2 până la 4 săptămâni după doza imediat anterioară. Alternativ, frecvența la care dozele secundare și/sau terțiare sunt administrate unui pacient poate varia pe parcursul regimului de tratament. Frecvența de administrare poate fi, de asemenea, ajustată în timpul tratamentului de către un medic, în funcție de nevoile pacientului în parte după examenul clinic.

EXEMPLE

Următoarele exemple sunt ilustrative și nu limitează domeniul de aplicare al revendicărilor.

Exemplu 1: Generarea de anticorpi anti-BCMA

Anticorpii anti-BCMA au fost obținuți prin imunizarea unui șoarece modificat genetic cu un antigen BCMA uman (de exemplu, hBCMA, SECV ID NR: 101) sau prin imunizarea unui șoarece modificat cuprinzând ADN care codifică regiuni variabile ale lanțului greu de imunoglobulină umană și kappa ușor cu un lanț uman. Antigenul BCMA.

După imunizare, splenocitele au fost recoltate de la fiecare șoarece și fie (1) fuzionate cu celule de mielom de șoarece pentru a-și păstra viabilitatea și a forma celule de hibridom și analizate pentru specificitatea BCMA, fie (2) celulele B sortate (așa cum este descris în US 2007/0280945A1) folosind un fragment BCMA uman ca reactiv de sortare care leagă și identifică anticorpii reactivi (celule B pozitive pentru antigen).

Anticorpii himerici la BCMA au fost inițial izolați având o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece. Anticorpii au fost caracterizați și selectați pentru a fi dezirabili caracteristici, inclusiv afinitatea, selectivitatea etc. Dacă este necesar, regiunile constante de șoarece au fost înlocuite cu o regiune constantă umană dorită, de exemplu regiunea constantă IgG1 sau IgG4 de tip sălbatic sau modificată, pentru a genera un anticorp anti-BCMA complet uman. În timp ce regiunea constantă selectată poate varia în funcție de utilizarea specifică, caracteristicile de legare a antigenului cu afinitate mare și specificitate țintă rezidă în regiunea variabilă.

Secvențele de aminoacizi și acid nucleic din regiunea variabilă a lanțului greu și ușor ale anticorpilor anti-BCMA. Tabelul 1 prezintă identificatorii secvenței de aminoacizi ai regiunilor variabile ale lanțului greu și ușor și CDR-urile anticorpilor anti-BCMA selectați conform invenției. Identificatorii de secvență de acid nucleic corespunzători sunt prezentați în Tabelul 2.

Tabelul 1: Identificatori de secvență de aminoacizi

Denumire anticorp	SECV ID NR:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb16716	18	20	22	24	26	28	30	32
mAb16732	34	36	38	40	42	44	46	48
mAb16747	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb21581	66	68	70	72	74	76	78	80

Tabelul 2: Identificatori de secvență de acid nucleic

Denumire anticorp	SECV ID NR:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb16716	17	19	21	23	25	27	29	31
mAb16732	33	35	37	39	41	43	45	47
mAb16747	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb21581	65	67	69	71	73	75	77	79

5 Exemplit 2: Generarea de receptori de antigen himeric specifici BCMA

Șase anticorpi anti-BCMA (mAb16711, mAb16716, mAb16732, mAb16747 și mAb21581) au fost reformatați în fragmente variabile cu lanț unic VL-VH (ScFv) și plasați într-un receptor himeric de antigen (CAR) care a folosit o balama CD8 α și un domeniu transmembranar, un domeniu costimulator 4-1BB și un domeniu stimulator CD3 ζ . CAR-urile specifice BCMA au fost donate într-un vector de expresie lentiviral (Lenti-X™ Bicistronic Expression System (Neo), Clontech Cat# 632181) și particulele lentivirale au fost generate prin sistemul Lenti-X Packaging Single-Shot (VSV-G) (Clontech Cat # 631276) conform protocoalelor producătorului. Celulele Jurkat proiectate pentru a exprima un reporter NFAT-luciferaza (Jurkat/NFATLuc cl. 3C7) au fost apoi transduși cu diferitele constructe CAR folosind Precoated Dishes RetroNectin® (Clontech, Cat # T110a) conform protocoalelor producătorului. După selecția timp de cel puțin 2 săptămâni în 500 μ g/ml G418 (Gibco, Cat # 11811-098), au fost generate următoarele linii de celule CAR-T; Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16716 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16711 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16732 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16747 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 21581 VL-VH CART. Secvențele de nucleotide ale constructelor CAR utilizate în generarea acestor linii de celule CAR-T, așa cum este ilustrat în Figura 1, sunt prezentate în SECV ID NR: 81 (mAb16711 VL/VH), 83 (mAb16716 VL/VH), 85 (mAb16732 VL/VH), 87 (mAb16747 VL/VH) și 89 (mAb21581 VL/VH). Aceste șase linii de celule CAR-T au fost utilizate pentru a evalua expresia suprafeței celulare și activarea celulelor BCMA CAR-T, așa cum s-a discutat în Exemplit 3.

Receptori de antigen himeric care conțin un scFv anti-BCMA VL-VH, un huCD8 domeniul transmembranar, un domeniu co-stimulator 4-1 BB și un domeniu de semnalizare CD3 ζ au fost construite folosind secvențele de nucleotide VL și VH a doi anticorpi anti-BCMA, mAb21581 și mAb16747 (corespunzător SEQ ID NR: 89 și respectiv 87). Ca un control care nu leagă, un CAR similar a fost proiectat utilizând secvența de nucleotide a unui scFv irelevant (constructul CAR din SECV ID NR: 91). Aceste CAR-uri au fost donate într-un vector lentiviral pLVX cu un promotor EF1 α și secvența IRES:eGFP (pentru urmărirea celulelor transduse cu CAR) și a fost produs lentivirusul pseudotipizat VSV.

Celulele T CD3+ au fost izolate din celulele mononucleare din sângele periferic uman (PBMC), stimulate cu microbile CD3/CD28 plus 100 U/ml IL-2 umană recombinată și transduse cu lentivirus la un MOI=5. Celulele transduse au fost extinse timp de 3 săptămâni cu microbile CD3/CD28 plus 100 U/ml IL-2 umană recombinată înainte de a fi crioconservate până la utilizare în timpul experimentului *in vivo*. Aceste trei linii de celule CAR-T au fost utilizate pentru a evalua eficacitatea în reducerea sarcinii tumorale *in vivo*, așa cum s-a discutat în exemplele 4 și 5.

Exemplul 3: Exprimarea suprafeței celulare a constructelor BCMA CAR în celulele Jurkat și activarea celulelor BCMA CAR-T

Expresia relativă a suprafeței celulare a constructelor BCMA CAR în celulele Jurkat/NFATLuc a fost accesată prin citometrie în flux. Pentru colorare, celulele au fost placate în tampon de colorare (PBS, fără calciu și magneziu (Irving 9240) + 2% FBS (ATCC 30-2020) la o densitate de 200.000 celule per godeu într-o placă cu fund V cu 96 de godeuri și colorate timp de 30 de ore. minute la 4°C cu 10 ug/ml din domeniul extracelular BCMA fuzionat la un hlgG1-Fc (BCMA ecto-hFc) sau o proteină irelevantă fuzionată la hlgG1-Fc (control izotip Fc). După incubarea cu control izotip BCMA-hFc sau Fc, celulele au fost spălate o dată în tampon de colorare și colorate cu un anticorp secundar conjugat Alexa-Flour 647 (Jackson ImmunoResearch, Cat # 109-606-170) la 10 mg/ml timp de 30 de minute. la 4°C. Celulele au fost apoi spălate și fixate folosind o soluție 50% de BD Cytotfix (BD, Cat # 554655) diluată în tampon de colorare. Probele au fost rulate pe citometrul de flux Intellicyt iQue și analizate cu FlowJo 10.2 pentru a calcula intensitatea fluorescență medie (MFI). Raportul semnal-zgomot (S:N) este determinat luând raportul dintre MFI de control izotip BCMA-hFc sau Fc la anticorpul secundar MFI singur.

Activitatea liniilor CAR-T a fost evaluată într-un biotest CAR-T/APC (celula prezentatoare de antigen). Pentru a efectua biotestul, 50.000 de celule CAR-T au fost adăugate la plăcile albe ThermoNunc cu 96 de godeuri (Thermo Scientific, Cat # 136101) în 50 ul de mediu de testare (medii RPMI cu 10% FBS și 1% P/S/G) urmată de adăugarea unei diluții în serie de trei ori a APC-urilor (500.000 celule la 685 celule) în 50 ul de mediu de testare. Au fost utilizate următoarele APC-uri: RAJI, Daudi, RPMI8226 (exprimă endogen BCMA) și HEK293 (BCMA negativ). Amestecul de celule a fost incubat la 37°C, 5% CO₂, incubator umidificat timp de 5 ore. Activitatea NFAT-Luciferazei a fost măsurată utilizând Promega One-Glo (Cat# E6130) și un cititor de plăci Perkin Elmer Envision. Unitățile de luciferază relativă (RLU) au fost generate și reprezentate grafic în GraphPad Prism utilizând o ecuație logistică cu patru parametri pe o curbă de răspuns în 8 puncte. Condiția APC zero pentru fiecare curbă doză-răspuns este de asemenea inclusă în analiză ca o continuare a diluției în serie de trei ori și este reprezentată ca doza cea mai mică. Activitatea CAR-T a fost determinată luând raportul dintre cel mai mare RLU de pe curbă și cel mai mic și este reprezentat ca semnal:zgomot (S:N) în tabelul 4.

Tabelul 3 arată că 16747 și 21581 CAR-T au avut o expresie similară la suprafață, cu S:N cuprins între 209-273, 16716 CAR-T exprimat la 44 de ori deasupra fundalului, în timp ce expresia 16732 și 16711 CAR a fost mult mai mică cu o S:N de 13 și, respectiv, 4.

Tabelul 4 arată că toate cele șase linii de celule BCMA CAR-T au fost activate de celulele RAJI, Daudi și RPMI8226. Nu au fost activate linii de celule CAR-T de HEK293. 16747 BCMA CAR a avut cea mai puternică activare în biotestul CAR-T/APC, în timp ce CAR 16711 a avut cea mai slabă activitate, indiferent de BCMA care exprimă APC. În cele din urmă, a fost observată o corelație între expresia CAR (Tabelul 3) și activitatea CAR (Tabelul 4).

Tabelul 3: Legarea FC-BCMA solubilă pe liniile celulare BCMA CAR-T

Linia celulară	S:N (BCMA-hFc)	S:N (Isotipe-hFc)
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7	1.5	0.8
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/16716 VL-VH CART	44.0	1.1
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/16711 VL-VH CART	3.7	1.2
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/16732 VL-VH CART	13.1	1.0
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/16747 VL-VH CART	209.2	1.3
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/21581 VL-VH CART	224.5	1.2

Tabelul 4: Activarea BCMA CAR-T într-un biotest CAR-T/APC

Celula care prezintă antigen	Activitate CAR-T Max					
	No CAR	16716	16711	16732	16747	21581
RAJI	1.2	16.3	7.9	16.8	38.9	26.9
Daudi	1.0	6.4	2.6	4.9	14.0	8.0
RPMI8226	0.8	6.6	1.8	5.2	12.5	12.3
HEK293	0.9	0.8	0.9	0.8	0.9	0.9

Exemplul 4: Celulele CAR-T vizate de BCMA reduc creșterea tumorilor care exprimă BCMA (OPM-2) in vivo într-un model de tumoră xenogenă

Pentru a determina eficacitatea in vivo a celulelor T receptorului antigen himeric (CAR) vizat de BCMA, a fost efectuat un studiu tumoral xenogen la șoareci folosind celule de mielom multiplu uman OPM-2, care exprimă niveluri ridicate de BCMA.

Implantarea și măsurarea tumorilor xenogene. În ziua 0, șoarecilor cu imunodeficiență NOD.Cg-Prkdc^{scid}II2rg^{tm1Wjl} (NSG) li s-au administrat intravenos 2×10^6 BCMA⁺ OPM-2 celule tumorale umane de mielom multiplu care au fost concepute pentru a exprima, de asemenea, luciferaza de licurici (celule OPM-2-luciferaza). În ziua 21, șoarecii au fost injectați intravenos cu celule T 2×10^6 care exprimă fie CAR de control, fie un CAR anti-BCMA (după cum este determinat de frecvența celulelor care exprimă GFP, care este un marker pentru acele celule care au fost transduse cu CAR). Șoarecilor (n=5 per grup) li s-au administrat 2×10^6 scFv CAR T irelevant (control scFv CAR), 2×10^6 anti-BCMA CAR T care codifică 21581 scFv CAR sau 2×10^6 anti-BCMA CAR T care codifică 16747 scFv. Creșterea tumorii a fost evaluată până în ziua 61 prin măsurarea bioluminescenței tumorii (BLI) la animalele anesteziate. Ca martor pozitiv, unui grup de șoareci (n=5) i s-a administrat numai celule OPM-2-luciferaze, dar nu și celule T. Pentru a măsura nivelurile de fond BLI, un grup de șoareci (n=5) au fost netratate și nu au primit tumori sau celule T.

Măsurarea creșterii tumorii xenogenice: imagistica BLI a fost utilizată pentru a măsura sarcina tumorală. Șoarecilor li s-a injectat IP cu 150 mg/kg de substrat de luciferază D-luciferină suspendată în PBS. La cinci minute după această injecție, imagistica BLI a șoarecilor a fost efectuată sub anestezie cu izofluran folosind sistemul Xenogen I VIS. Achiziția imaginii a fost efectuată cu câmpul vizual la D, înălțimea subiectului de 1,5 cm și nivel mediu de binning cu timpul de expunere automat determinat de Living Image Software. Semnalele BLI au fost extrase folosind software-ul Living Image: regiunile de interes au fost desenate în jurul fiecărei mase tumorale și intensitățile fotonilor au fost înregistrate ca p/s/cm²/sr.

În timp ce tumorile BCMA⁺ OPM-2-luciferaza au crescut progresiv la șoarecii care au primit celule T scFv CAR irelevante, celulele CAR T care codifică 21581 scFv CAR au redus sarcinile tumorale la nivelurile de fond la majoritatea animalelor și celulele CAR T care codifică 16747 scFv CAR au redus sarcina tumorii la nivelurile de fond la toate animalele. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 5a de mai jos.

Tabelul 5a: Dimensiunea medie a tumorii (după strălucire) la diferite momente de timp

CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm ² /sr] 5 zile după implantare (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	6.22E+05 ± 2.77E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	5.62E+05 ± 2.75E+04
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	5.95E+05 ± 2.40E+04
Anti-BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ celule	6.07E+05 ± 3.97E+04
Anti-BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ celule	5.54E+05 ± 2.80E+04
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm ² /sr] 11 zile după implantare (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	6.90E+05 ± 3.64E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	6.22E+05 ± 3.34E+04
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	6.80E+05 ± 2.76E+04
Anti-BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ celule	7.13E+05 ± 2.90E+04
Anti-BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ celule	6.30E+05 ± 2.42E+04
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm ² /sr] 20 zile după implantare (medie ± SEM)

Fără tumoare (fond BLI)	7.59E+05 ± 5.82E+04
Fără CAR T (control)	2.32E+06 ± 2.94E+05
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	2.80E+06 ± 5.26E+05
Anti-BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ celule	3.06E+06 ± 4.42E+05
Anti-BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ celule	2.53E+06 ± 2.22E+05
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²/sr] 26 zile după implantare (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	5.51 E+05 ± 2.51 E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	5.96E+06 ± 8.74E+05
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	8.03E+06 ± 1.41E+06
Anti-BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ celule	6.76E+06 ± 1.34E+06
Anti-BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ celule	6.96E+06 ± 3.39E+05
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²/sr] 31 zile după implantare (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	6.62E+05 ± 3.35E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	1.58E+07 ± 4.84E+06
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	1.57E+07 ± 3.05E+06
Anti-BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ celule	1.44E+07 ± 2.12E+06
Anti-BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ celule	1.01E+07 ± 5.46E+05

Un alt experiment a fost efectuat așa cum s-a discutat mai sus, cu excepția faptului că șoarecii au fost injectați intravenos cu 2x10⁶ celule T care exprimă fie CAR de control, fie un CAR anti-BCMA în ziua 22 (în loc de ziua 21), iar creșterea tumorii a fost evaluată până în ziua 56 (mai degrabă decât ziua 61).

În timp ce tumorile BCMA + OPM-2-luciferaza au crescut progresiv la șoarecii care au primit celule T scFv CAR irelevante, celulele T CAR care codifică CAR-urile scFV 21581 și 16747 au redus sarcinile tumorale la nivelurile de fond la toate animalele. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 5b de mai jos.

Tabelul 5b: Dimensiunea medie a tumorii (după strălucire) la diferite momente de timp

CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²/sr] 14 zile după implantare (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	6.72E+05 ± 1.50E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	7.93E+05 ± 8.18E+04
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	7.09E+05 ± 2.13E+04
Anti-BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ celule	7.87E+05 ± 1.20E+05
Anti-BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ celule	8.93E+05 ± 9.05E+04
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²/sr] 20 zile după implantare (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	5.32E+05 ± 3.64E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	3.07E+06 ± 3.01 E+05

MD/EP 3823665 T2 2024.05.31

32

Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	2.91E+06 ± 2.46E+05
Anti-BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ celule	2.57E+06 ± 8.27E+05
Anti-BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ celule	3.13E+06 ± 5.97E+05
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²²/sr] 23 zile după implantare (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	5.56E+05 ± 4.29E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	1.01 E+07 ± 1.28E+06
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	8.37E+06 ± 1.38E+06
Anti-BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ celule	1.00E+07 ± 3.92E+06
Anti-BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ celule	8.26E+06 ± 1.59E+06
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²²/sr] 27 zile după implantare (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	5.18E+05 ± 2.87E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	1.67E+07 ± 1.54E+06
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	1.47E+07 ± 2.36E+06
Anti-BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ celule	1.59E+07 ± 6.36E+06
Anti-BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ celule	1.03E+07 ± 1.71E+06
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²²/sr] 30 zile după implantare (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	5.18E+05 ± 1.29E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	1.93E+07 ± 3.10E+06
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	2.03E+07 ± 2.48E+06
Anti-BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ celule	7.21E+06 ± 1.97E+06
Anti-BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ celule	1.16E+07 ± 3.61E+06
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²²/sr] 34 zile după implantare (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	5.66E+05 ± 3.76E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	3.69E+07 ± 6.27E+06
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	4.07E+07 ± 4.13E+06
Anti-BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ celule	5.74E+05 ± 1.24E+04
Anti-BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ celule	1.66E+06 ± 9.09E+05
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²²/sr] 38 days post-implantation (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	5.43E+05 ± 3.32E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	Animale eutanasiate
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	5.87E+07 ± 5.72E+06
Anti-BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ celule	5.39E+05 ± 1.58E+04
Anti-BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ celule	5.55E+05 6 5.02E+04
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²²/sr] 44 zile după implantare

	(medie \pm SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	6.42E+05 \pm 3.33E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	Animale eutanasiate
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	Animale eutanasiate
Anti-BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ celule	6.68E+05 \pm 3.09E+04
Anti-BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ celule	5.39E+05 \pm 2.25E+04
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²/sr] 56 zile după implantare (medie \pm SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	8.10E+05 \pm 5.92E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	Animale eutanasiate
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ celule	Animale eutanasiate
Anti-BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ celule	6.37E+05 \pm 2.71E+04
Anti-BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ celule	7.13E+05 \pm 4.17E+04

Exemplul 5: Celulele CAR-T vizate de BCMA reduc creșterea tumorilor care exprimă BCMA (MOLP-8) in Vivo într-un model de tumoră xenogenă

Pentru a determina eficacitatea in vivo a celulelor T ale receptorului antigen himeric (CAR) vizat de BCMA, a fost efectuat un studiu de tumoră xenogenă la șoareci folosind celule de mielom multiplu uman MOLP-8, care exprimă niveluri scăzute de BCMA.

Implantarea și măsurarea tumorilor xenogene. În ziua 0, șoarecilor imunodeficienți NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rgtm^{1Wj}SzJ (NSG) li s-au administrat intravenos 2x10⁶ BCMA⁺MOLP-8 celule tumorale umane de mielom multiplu care au fost concepute pentru a exprima, de asemenea, luciferaza de licurici (celule MOLP-8-luciferaza). În ziua 12, șoarecii au fost injectați intravenos cu 2x10⁶ celule T care exprimă fie CAR de control, fie un CAR anti-BCMA (după cum este determinat de frecvența celulelor care exprimă GFP, care este un marker pentru acele celule care au fost transduse cu CAR). Șoarecilor (n=5 per grup) li sa administrat 2x10⁶ scFv CAR T irelevant (control scFv CAR), 2x10⁶ anti-BCMA CAR T care codifică 21581 scFv CAR sau 2x10⁶ anti-BCMA CAR T care codifică 16747 scFv. Creșterea tumorii a fost evaluată pe parcursul experimentului prin măsurarea bioluminescenței tumorii (BLI) la animalele anesteziate. Ca martor pozitiv, unui grup de șoareci (n=5) i sa administrat numai celule MOLP-8-luciferazei, dar nu și celule T. Pentru a măsura nivelurile de fond BLI, un grup de șoareci (n=5) au fost netratate și nu au primit tumori sau celule T.

Măsurarea creșterii tumorii xenogenice: imagistica BLI a fost utilizată pentru a măsura sarcina tumorală. Șoarecilor li s-a injectat IP cu 150 mg/kg de substrat de luciferază D-luciferină suspendată în PBS. La cinci minute după această injecție, imagistica BLI a șoarecilor a fost efectuată sub anestezie cu izofluran folosind sistemul Xenogen I VIS. Achiziția imaginii a fost efectuată cu câmpul vizual la D, înălțimea subiectului de 1,5 cm și nivel mediu de binning cu timpul de expunere automat determinat de Living Image Software. Semnalele BLI au fost extrase folosind software-ul Living Image: regiunile de interes au fost desenate în jurul fiecărei mase tumorale și intensitățile fotonilor au fost înregistrate ca p/s/cm²/sr.

În timp ce tumorile BCMA + MOLP-8-luciferaza au crescut progresiv la șoarecii care au primit celule T scFv CAR irelevante, celulele T CAR care codifică 21581 scFv CAR și 16747 scFv CAR au redus sarcinile tumorale la nivelurile de fond la toate animalele. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 6 de mai jos.

Tabelul 6: Dimensiunea medie a tumorii (după strălucire) la diferite momente de timp

CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm ² /sr] 12 zile după implantare (medie \pm SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	6.81 E+05 \pm 3.46E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	1.51E+06 \pm 7.81 E+04
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ cells	1.72E+06 \pm 1.33E+05

Anti-BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ cells	1.46E+06 ± 1.01 E+05
Anti-BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ cells	1.32E+06 ± 5.86E+04
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²/sr] 18 zile după implantare (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	7.61 E+05 ± 2.73E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	2.01E+07 ± 8.14E+05
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ cells	2.11 E+07 ± 3.02E+06
Anti-BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ cells	5.37E+06 ± 9.01 E+05
Anti-BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ cells	6.98E+06 ± 9.57E+05
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²/sr] 25 zile după implantare (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	7.20E+05 ± 2.31E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	5.93E+07 ± 7.71 E+06
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ cells	6.40E+07 ± 1.71E+07
Anti-BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ cells	7.50E+05 ± 4.63E+04
Anti-BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ cells	6.77E+05 ± 7.41 E+04
CAR T Tratament	Strălucire [p/s/cm²/sr] 32 zile după implantare (medie ± SEM)
Fără tumoare (fond BLI)	6.85E+05 ± 3.99E+04
Fără CAR T (control pozitiv)	Animale eutanasiate
Control CAR T (Irelevant scFv) 2x10 ⁶ cells	Animale eutanasiate
Anti-BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ cells	6.28E+05 ± 3.75E+04
Anti-BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ cells	6.82E+05 ± 2.35E+04

Exemplul 6: Celulele CAR-T specifice BCMA mediază citoliza celulelor care exprimă BCMA

5 Celulele T CD3⁺ au fost izolate din celulele mononucleare din sângele periferic uman (PBMC), stimulate cu microbule CD3/CD28 plus 100 U/ml IL-2 umană recombinată și transduse cu lentivirus la un MOI=5, așa cum s-a discutat mai sus în Exemplul 2. Celulele transduse au fost extinse timp de 3 săptămâni cu microbule CD3/CD28 plus 100 U/ml IL-2 umană recombinată înainte de a stabili un test citolitic.

10 Pentru a determina capacitatea citolitică a celulelor T receptorului de antigen himeric (CAR) vizat de BCMA, a fost efectuat un test citolitic utilizând celule CAR-T extinse și diferite linii de celule țintă tumorale care exprimă niveluri variabile de BCMA. În ziua 21 de expansiune, celulele CAR-T expandate au fost co-cultivate în triplicat în diferite rapoarte cu linii celulare țintă BCMA+ marcate cu calceină. Fiecare linie celulară țintă a fost recoltată și resuspendată la o densitate de 2x10⁶/ml înainte de a adăuga colorant calceină-AM la o concentrație de 8 uM timp de 35 de minute la 37°C. După marcarea cu calceină, celulele țintă au fost spălate de două ori pentru a îndepărta calceina suplimentară. Ulterior, celulele T și celulele țintă au fost co-cultivate pe o placă cu fund rotund cu 96 de godeuri în diferite rapoarte și cultivate la 37°C timp de 2,5 ore când a fost recoltat supernatantul de cultură. Pentru un control negativ, celulele țintă au fost co-cultivate cu celule T generate folosind un CAR similar proiectat să conțină un scFv irelevant care nu recunoaște BCMA. Ca un control suplimentar CAR negativ, au fost utilizate celule T netransduse și expandate de la același donator normal sănătos. Ca control pentru

15

20

distrugerea mediată de celulele CAR-T specifice antigenului, linia celulară țintă a leucemiei mieloide cronice K562 a fost utilizată deoarece această linie celulară este negativă pentru expresia BCMA. Pentru a determina dacă calceina este eliberată spontan din liniile celulare țintă H-929 și MOLP-8, fiecare linie celulară a fost cultivată în absența celulelor CAR-T. Pentru a determina eliberarea maximă posibilă de calceină, liniile de celule țintă au fost cultivate și lizate folosind mediu Optimizer care a fost suplimentat pentru a conține 1% detergent Triton™ X-114. În supernatant, nivelurile relative de calceină au fost măsurate utilizând un cititor de plăci Viktor X4 și citotoxicitatea procentuală a fost calculată ca ((semnal Calceină - Eliberare spontană de Calceină) / (Eliberare maximă de Calceină - Eliberare spontană de Calceină))*100.

După cum se arată în tabelele 7A-7C, mai jos, culturile constând din celule T CAR+ țintite BCMA generate folosind scFv 21581 și 16747 au indus citoliza robustă a celulelor țintă H-929 și a celulelor țintă MOLP-8. În comparație cu celulele H-929, a fost observat un nivel mai scăzut de citotoxicitate împotriva celulelor MOLP8. Acest rezultat este explicat prin H-929 care exprimă niveluri mai mari de antigen BCMA decât celulele MOLP-8. Pentru fiecare cultură de celule CAR-T țintite de BCMA, cel mai mare grad de citotoxicitate a fost observat împotriva celulelor H-929, iar celulele CAR-T țintite de BCMA proiectate cu scFv 16747 au produs cea mai mare magnitudine de citotoxicitate împotriva ambelor linii celulare țintă. Atât celulele T netransduse și extinse (MOI 0), cât și celulele CAR-T irelevante (17363), atunci când au fost co-cultivate cu celule țintă la un raport maxim de 50 de celule T la o celulă țintă, nu au reușit să provoace nicio citoliză a MOLP celule țintă -8 și H-929. Acest rezultat ilustrează faptul că citoliza este observată numai atunci când structura CAR conține scFv care recunoaște BCMA (de exemplu, din mAb21581 și mAb16747). În plus, celulele CAR-T vizate de BCMA au demonstrat o citotoxicitate neglijabilă față de celulele K562 cărora le lipsește expresia BCMA, ceea ce indică faptul că expresia BCMA este necesară pentru ca citoliza să fie observată.

Tabelul 7A: Citoliza celulelor CAR-T dirijată de BCMA

T efector: Raport celulă țintă	CAR-T celulă / celulă țintită							
	21581 / MOLP8		21581 / H929		16747 / MOLP8		16747 / H929	
	medie	SD	medie	SD	medie	SD	medie	SD
50	9.1	2.0	22.3	0.7	14.0	1.5	29.3	1.8
25	3.7	0.8	10.0	0.9	10.9	2.0	19.4	3.4
12.5	1.6	0.6	3.9	1.4	8.2	0.9	9.3	3.2
6.25	0.6	0.5	1.7	0.7	5.8	1.3	4.2	2.6
3.13	-1.5	0.3	0.0	1.1	2.2	0.9	2.9	2.4
1.56	0.3	0.5	-0.9	2.4	0.2	0.7	1.8	2.3
0.78	-1.3	2.2	-0.7	0.5	-2.9	0.5	0.9	1.7
SD: abatere standard								

Tabelul 7B: Citoliza celulelor CAR-T dirijată de BCMA

T efector: Raport celulă țintă	CAR-T celulă / Celulă țintită							
	17363 HPV16 / MOLP8		17363 HPV16 / H929		21581 / K562		16747 / K562	
	medie	SD	medie	SD	medie	SD	medie	SD
50	-3.1	1.7	-0.8	1.2	2.0	1.1	3.5	1.4
SD: abatere standard								

Tabelul 7C: Citoliza celulelor CAR-T dirijată de BCMA

T efector: Raport celulă țintă	CAR-T celulă / celulă țintă			
	CAR Neg T cells / MOLP8		CAR Neg T cells / H929	
	medie	SD	medie	SD
50	-1.4	2.0	-0.5	1.5
SD: abatere standard				

Exemplul 7: Citotoxicitatea ex vivo a celulelor CAR-T vizate de BCMA în măduva osoasă derivată de la pacient cu mielom multiplu

Celulele T CD3+ au fost izolate din celulele mononucleare din sângele periferic uman (PBMC), stimulate cu microbule CD3/CD28 plus 100 U/ml IL-2 umană recombinată și transduse cu lentivirus la un MOI=5, așa cum s-a discutat mai sus în Exemplul 2. Celulele transduse au fost extinse timp de 3 săptămâni cu microbule CD3/CD28 plus 100 U/ml IL-2 umană recombinată înainte de a stabili un test de citotoxicitate.

La recoltare, celulele CAR-T în expansiune au fost spălate și resuspendate în mediu complet (RPMI suplimentat cu 10% FBS, 100 U/mL penicilină, 100 μg/mL streptomycin și 292 μg/mL L-glutamina). Măduva osoasă de la pacienții cu mielom multiplu a fost dezghețată și resuspendată în mediu complet. Celulele stromale HS-5 au fost placate în plăci cu fund plat cu 96 de godeuri la 10000 celule per godeu și incubate peste noapte. Celulele T și măduva osoasă derivată de la pacient au fost adăugate în godeurile care conțin stromală la diferite rapoarte E:T (titrări de 2 ori începând de la E:T=10:1) și cultivate la 37°C timp de 12 ore. Ca martor negativ CAR, au fost utilizate celule T netransduse și expandate de la același donator normal sănătos.

După 12 ore, supraviețuirea blastelor de mielom multiplu a fost determinată utilizând citometrie în flux. Celulele au fost colorate cu un cocktail de anticorpi conjugați cu fluorofor (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD16, anti-CD45, anti-CD90, anti-CD138 și anti-SlamF7) în BD Horizon Brilliant Stain Buffer timp de 30 de minute la 4°C. Celulele au fost spălate o dată în PBS și colorate cu LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain timp de 20-30 de minute la 4°C urmate de două spălări în PBS și resuspendate în tampon Miltenyi AutoMacs rece. Granulele CountBright au fost adăugate la probe pentru a cuantifica numărul absolut de celule per godeu. Probele au fost analizate pe un citometru de flux BD FortessaX20. Supraviețuirea blastelor de mielom multiplu au fost închise ca vii singur CD4-/CD8-/SlamF7+/CD138+. Supraviețuirea procentuală a fost calculată ca număr absolut de blaste vii de mielom multiplu în proba tratată normalizată pentru celule vii de mielom multiplu în martorul netratat.

Culturile constând din celule T CAR+ țintite de BCMA generate folosind mAb21581 VH/VL au indus citoliză specifică țintă robustă a blastelor de mielom multiplu de la 2 pacienți nou diagnosticați și 1 pacient recidivat. La raportul E:T 10:1, 87-94% din blastele de mielom multiplu au fost lizate. Celulele T netransduse și expandate (MOI 0) au lizat 34-0% din blaturile de mielom multiplu. Acest rezultat demonstrează capacitatea celulelor CAR+ T vizate de BCMA de a liza puternic blastele de mielom multiplu derivate de la pacient într-un mod specific țintă. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 8 de mai jos.

Tabelul 8: % de supraviețuire a blastelor de mielom multiplu în citoliza celulelor CAR-T direcționată de BCMA

Probă ID	MM453		MM511		MM455	
Statusul bolii	Diagnosticat recent		Diagnosticat recent		recidivat	
% MM blaste	25%		38%		90%	
BCMA ABC on MM	12302		2631		46925	
T celulă:Raport celulă țintă	BCMA CAR-T	control T	BCMA CAR-T	control T	BCMA CAR-T	control T
10	7	66	11	85	13	156
5	15	66	19	91	32	155
2.5	23	90	28	82	81	148
1.25	49	77	37	92	81	104
0.625	82	92	56	92	98	112
0.312	108	92	100	100	98	102

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- SMITH E.L. ET AL.: "Development and evaluation of an optimal human single-chain variable fragment-derived BCMA-targeted CAR T cell vector.", MOL. THER., vol. 26, no. 6, 6 June 2018 (2018-06-06), pages 1447-1456, XP002795010,
- WO-A1-2019/149249
- HARRINGTON K. ET AL.: "Development of JCARH125: Optimization of a Fully Human Anti-Bcma CAR for Use in the Treatment of Multiple Myeloma", BLOOD, vol. 130, no. S1, 7 December 2017 (2017-12-07), page 1813, XP002795011,

(57) Revendicări:

1. Un receptor de antigen himeric specific pentru antigenul de maturare a celulei B (BCMA) care cuprinde, de la capătul N-terminal la capătul C-terminal:

(a) un domeniu de legare a ligandului extracelular care cuprinde un domeniu de legare a antigenului anti-BCMA;

(b) o balama;

(c) un domeniu transmembrantar; și

(d) un domeniu citoplasmatic cuprinzând un domeniu costimulator de la 4-1BB și un domeniu de semnalizare de la CD3zeta; în care domeniul extracelular de legare a ligandului este un domeniu anti-BCMA cu un singur lanț variabil (scFv) care cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) și o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) unite printr-un linker, în care LCVR cuprinde domeniile LCDR1-LCDR2-LCDR3 stabilite în SECV ID NR: 60-62-64, respectiv, iar HCVR cuprinde domeniile HCDR1-HCDR2-HCDR3 stabilite în SECV ID NR: 52-54-56, respectiv

2. Receptorul de antigen himeric conform revendicării 1, în care linkerul cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 93-96.

3. Receptorul de antigen himeric conform revendicării 1 sau 2, în care LCVR cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 58 și HCVR cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 50.

4. Receptorul de antigen himeric conform oricăreia dintre revendicările 1-3, în care:

(a) balama cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 97;

(b) domeniul transmembrantar cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 98;

(c) domeniul costimulator cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 99; sau

(d) domeniul de semnalizare cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 100.

5. Receptorul de antigen himeric conform revendicării 1, în care receptorul de antigen himeric cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 88.

6. O moleculă izolată de acid nucleic care codifică receptorul de antigen himeric conform oricăreia dintre revendicările 1-5, opțional în care molecula de acid nucleic cuprinde o secvență de nucleotide a SECV ID NR: 87.

7. Un vector cuprinzând molecula de acid nucleic conform revendicării 6, în care, opțional, vectorul este un vector ADN, un vector ARN, o plasmidă, un vector lentivirus, un vector adenovirus sau un vector retroviral.

8. O celulă cuprinzând o moleculă de acid nucleic conform revendicării 6 sau un vector conform revendicării 7, opțional în care celula este o celulă T umană.

9. O celulă modificată cuprinzând un receptor de antigen himeric conform oricăreia dintre revendicările 1-5.

10. Celulă proiectată conform revendicării 9, în care:

(a) celula modificată este o celulă imunitară;

(b) celula modificată este o celulă imună și celula imună este o celulă efectoră imună;

(c) celula modificată este un limfocit T; sau

(d) celula modificată este un limfocit T și limfocitul T este un limfocit T inflamator, un limfocit T citotoxic, un limfocit T reglator sau un limfocit T helper, opțional un limfocit T citotoxic CD8+.

11. O populație de celule modificate, care poate fi obținută prin

(a) furnizarea unei populații de celule imune, care au fost obținute de la un subiect;

(b) introducerea în celulele imune a unei molecule de acid nucleic care codifică un receptor de antigen himeric conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 5;

(c) cultivarea celulelor imune în condiții pentru a exprima moleculele de acid nucleic; și

(d) izolarea celulelor imune care exprimă receptorul de antigen himeric la suprafața celulelor.

12. O compoziție farmaceutică care cuprinde una dintre:

(a) o celulă T umană modificată genetic și un purtător acceptabil farmaceutic, în care celula T umană modificată genetic cuprinde un receptor de antigen himeric conform oricăreia dintre revendicările 1-5; sau

(b) o celulă proiectată conform revendicării 9 și un purtător acceptabil farmaceutic; sau

(c) o celulă proiectată conform revendicării 10 și un purtător acceptabil farmaceutic.

13. Celula modificată conform revendicării 10, sau populația de celule modificate conform revendicării 11, pentru utilizare în tratamentul unui cancer care exprimă BCMA la un subiect, de preferință un subiect uman, prin asigurarea imunității antitumorale la subiect, în care celulele sunt administrate într-o cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic pentru a (a) spori activitatea limfocitelor T la subiectul primitor sau (b) stimula un răspuns imun mediat de celule T la o populație de celule țintă sau la un țesut la subiectul primitor.

14. Celulele modificate sau populație de celule modificate pentru utilizare conform revendicării 13, în care cancerul este mielom multiplu, leucemie limfoblastică acută din linia B, leucemie limfocitară cronică cu celule B, limfom non-Hodgkin cu celule B, leucemie și limfom acut. leucemie limfoblastică, limfom Hodgkin sau leucemie limfoblastică acută din copilărie.

15. O metodă de proiectare a unei populații de celule pentru a exprima un receptor de antigen himeric, cuprinzând:

(a) furnizarea unei populații de celule imune, care au fost obținute opțional de la un subiect;

(b) introducerea în celulele imune a unei molecule de acid nucleic care codifică un receptor de antigen himeric al oricărui receptor conform revendicărilor 1-5;

(c) cultivarea celulelor imune în condiții pentru a exprima molecula de acid nucleic; și

(d) izolarea celulelor imune care exprimă receptorul de antigen himeric la suprafața celulelor.

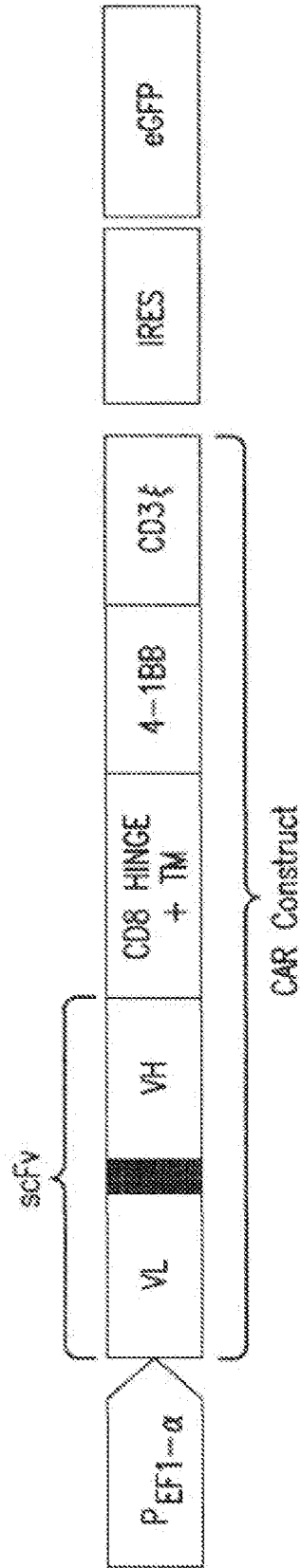


FIG. 1