

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3334765 DAL TITOLO:

"Recettori antigenici chimerici basati su anticorpi a dominio singolo e relativi metodi di utilizzo"

Depositata il:

*** **

DESCRIZIONE

CAMPO DELLA PRESENTE INVENZIONE

La presente invenzione riguarda recettori antigenici chimerici comprendenti anticorpi a dominio singolo, cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate e il loro utilizzo. La presente divulgazione riguarda inoltre l'attivazione e l'espansione di cellule per usi terapeutici, in particolare per l'immunoterapia con cellule T basate su recettori antigenici chimerici.

CONTESTO DELLA PRESENTE INVENZIONE

Con lo sviluppo dell'immunoterapia dei tumori e della tecnologia clinica, l'immunoterapia con cellule T con recettore antigenico chimerico (CAR-T) è oggi uno degli approcci più promettenti all'immunoterapia dei tumori. In genere, un recettore antigenico chimerico (CAR) comprende un dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare. Il dominio extracellulare di legame con l'antigene può comprendere un frammento variabile a catena singola (scFv) mirato a un antigene tumorale identificato. I CAR possono essere espressi sulla superficie delle cellule T mediante tecniche di trasfezione genica. Quando si legano all'antigene tumorale target, i CAR possono attivare le cellule T per lanciare una risposta antitumorale specifica in modo antigene-dipendente, senza essere limitati dalla disponibilità di complessi maggiori di istocompatibilità (MHC) specifici per l'antigene tumorale target.

Gli anticorpi a dominio singolo (sdAb) si differenziano dagli anticorpi convenzionali a 4 catene per il fatto di avere un dominio singolo variabile anticorpale monomero. Ad esempio, i camelidi e gli squali producono anticorpi a dominio singolo denominati anticorpi a sola catena pesante (HcAb), che naturalmente mancano di catene leggere. Il frammento che lega l'antigene in ciascun braccio degli anticorpi camelidi a sola catena pesante ha un dominio singolo variabile della catena pesante (V_{HH}), che può avere un'elevata affinità con un antigene senza l'aiuto di una catena leggera. Il V_{HH} dei camelidi è noto come il più piccolo frammento funzionale che lega l'antigene, con un peso molecolare di circa 15 kD.

WO 2013/123061 si riferisce a CAR bispecifici basati su scFv.

Grada et al., Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2013, Vol. 2, e105, ha studiato un TanCAR che mediava l'attivazione e il targeting bispecifici delle cellule T.

Jamnani et al., Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 2014, Vol. 1840, n. 1, pagine 378-386, ha riportato CAR oligoclonali anti-HER2 comprendenti un singolo dominio V_HH.

BREVE SOMMARIO DELLA PRESENTE INVENZIONE

La presente invenzione fornisce recettori antigenici chimerici (CAR) basati su anticorpi a dominio singolo (V_HH), cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate e il loro utilizzo nell'immunoterapia del cancro, come definito nelle rivendicazioni.

La presente invenzione fornisce un recettore antigenico chimerico (CAR) costituito da un polipeptide che comprende un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un primo anticorpo a singolo dominio (sdAb) che si lega specificamente a un primo antigene e un secondo sdAb che si lega specificamente a un secondo antigene, dove ciascuno tra il primo e il secondo sdAb è un V_HH; un dominio transmembrana; e un dominio di segnalazione intracellulare.

In una forma di realizzazione, il primo antigene e il secondo antigene sono selezionati dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77.

In una forma di realizzazione, il primo antigene è diverso dal secondo antigene. In una forma di realizzazione, il primo sdAb è un sdAb anti-BCMA e il secondo sdAb è un sdAb anti-CD38. In un'altra forma di realizzazione, il primo sdAb è un sdAb anti-BCMA e il secondo sdAb è un sdAb anti-CD19. In un'ulteriore forma di realizzazione, il primo sdAb è un sdAb anti-CD19 e il secondo sdAb è un sdAb anti-CD20. In un'ulteriore forma di realizzazione, il primo sdAb è un sdAb anti-CD19 e il secondo sdAb è un sdAb anti-CD22.

In una forma di realizzazione, il primo antigene è identico al secondo antigene. In una forma di realizzazione, il primo sdAb e il secondo sdAb si legano specificamente allo stesso epitopo. In una forma di realizzazione, il primo sdAb e il secondo sdAb si legano specificamente ad epitopi diversi.

In una forma di realizzazione, il primo sdAb e/o il secondo sdAb è un sdAb anti-CD19 comprendente una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:1, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3. In una forma di realizzazione, il primo sdAb e/o il secondo sdAb è un sdAb anti-CD20 comprendente una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:4, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:5 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:6.

In una forma di realizzazione, il primo sdAb e/o il secondo sdAb è un sdAb anti-BCMA comprendente uno qualsiasi di quanto segue:

(1) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:18; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:29;

- (2) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:8; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:19; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:30;
- (3) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:10; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:21; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:32;
- (4) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:22; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:33;
- (5) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:12; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:23; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:34;
- (6) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:13; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:24; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:35;
- (7) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:14; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:25; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:36;
- (8) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:15; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:26; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:37; o
- (9) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:17; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:28; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:39.

In una forma di realizzazione, il primo sdAb e/o il secondo sdAb è un sdAb anti-CD38 comprendente uno qualsiasi di quanto segue:

- (1) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:40; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:52; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:64;
- (2) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:41; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:53; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:65;
- (3) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:42; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:54; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:66;
- (4) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:43; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:55; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:67;

(5) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:44; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:56; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:68;

(6) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:45; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:57; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:69;

(7) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:46; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:58; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:70;

(8) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:47; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:59; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:71;

(9) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:48; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:60; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:72;

(10) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:49; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:61; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:73;

(11) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:50; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:62; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:74; o

(12) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:51; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:63; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:75.

In una forma di realizzazione, il primo sdAb è localizzato in corrispondenza del terminale N del secondo sdAb. In un'altra forma di realizzazione, il primo sdAb è localizzato in corrispondenza del terminale C del secondo sdAb.

In una forma di realizzazione, il primo sdAb e/o il secondo sdAb sono camelidi, chimerici o umanizzati.

In una forma di realizzazione, il primo sdAb e il secondo sdAb sono direttamente fusi l'uno all'altro attraverso un legame peptidico. In alcune una forma di realizzazione, il primo sdAb e il secondo sdAb sono fusi l'uno all'altro tramite un linker peptidico. Preferibilmente, il linker peptidico non supera i 50 amminoacidi.

In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è derivato da una molecola selezionata dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1.

In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula

effettrice immunitaria. Il dominio primario di segnalazione intracellulare può essere derivato da CD3 ζ .

In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. Il dominio di segnalazione co-stimolatoria può essere derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni.

In una forma di realizzazione, il CAR comprende inoltre un dominio cerniera localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare legante l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In una forma di realizzazione, il CAR comprende inoltre un peptide segnale localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide.

In una forma di realizzazione, il CAR comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO:200, 201 e 206-216.

La presente invenzione fornisce anche un acido nucleico isolato che comprende una sequenza di acido nucleico che codifica il CAR della presente invenzione.

La presente invenzione fornisce anche un vettore contenente l'acido nucleico isolato della presente invenzione.

La presente invenzione fornisce anche una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata che comprende il CAR, l'acido nucleico isolato o il vettore della presente invenzione. In una forma di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è una cellula T.

La presente invenzione fornisce anche una composizione farmaceutica che comprende la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata della presente invenzione e un carrier farmaceuticamente accettabile.

La presente invenzione fornisce inoltre una composizione farmaceutica della presente invenzione per l'uso in un metodo di trattamento del cancro in un individuo, in cui il primo antigene e il secondo antigene sono antigeni tumorali. In una forma di realizzazione, il cancro è mieloma multiplo, leucemia linfoblastica acuta o leucemia linfocitica cronica. 1

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un sdAb anti-CD19 comprendente le regioni CDR di SEQ ID NO: 76. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:1, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 comprende un dominio V_HH comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76.

Viene presentato come riferimento un anticorpo a sola catena pesante (HcAb) anti-CD19 o una proteina legante l'antigene comprendente uno qualsiasi degli sdAb anti-CD19 descritti sopra.

Una forma di realizzazione della presente invenzione fornisce un recettore antigenico chimerico CD19 dell'invenzione comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD19 (come uno qualsiasi degli sdAb anti-CD19 descritti sopra); (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, il CAR è monospecifico. Il CAR può essere descritto come multivalente (per esempio bivalente o trivalente). In alcune forme di realizzazione, il CAR è multispecifico (per esempio bispecifico).

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un sdAb anti-CD20 comprendente le regioni CDR di SEQ ID NO: 77. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD20 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:4, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:5 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:6. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD20 comprende un dominio V_HH comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77.

Viene presentato come riferimento un anticorpo a sola catena pesante (HCAB) anti-CD20 o una proteina legante l'antigene comprendente uno qualsiasi degli sdAb anti-CD20 descritti sopra.

Una forma di realizzazione della presente invenzione fornisce un recettore antigenico chimerico CD20 dell'invenzione comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD20 (come uno qualsiasi degli sdAb anti-CD20 descritti sopra); (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, il CAR è monospecifico. Il CAR può essere descritto come multivalente (per esempio bivalente o trivalente). In alcune forme di realizzazione, il CAR è multispecifico (per esempio bispecifico).

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un sdAb anti-BCMA comprendente le regioni CDR di una qualsiasi di SEQ ID NO: 78-88. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA comprende uno qualsiasi di quanto segue:

(1) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:18; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:29;

(2) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:8; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 19; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 30;

(3) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:9; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:20; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:31;

(4) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:10; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:21; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:32;

(5) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:22;

e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:33;

(6) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:12; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:23;

e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:34;

(7) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:13; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:24;

e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:35;

(8) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:14; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:25;

e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 36;

(9) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:15; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:26;

e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 37;

(10) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:16; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:27;

e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:38; o

(11) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 17; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:28; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 39.

In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA comprende un dominio $V_{H}H$ che comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO:78-88.

Come riferimento, viene presentato un anticorpo solo a catena pesante anti-BCMA (HCAB) o una proteina legante l'antigene che comprende uno qualsiasi degli sdAb anti-BCMA sopra descritti.

Una forma di realizzazione della presente invenzione fornisce un recettore antigenico chimerico BCMA dell'invenzione comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-BCMA (come uno qualsiasi degli sdAb anti-BCMA descritti sopra); (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, il CAR è monospecifico. Il CAR può essere descritto come multivalente (per esempio bivalente o trivalente). In alcune forme di realizzazione, il CAR è multispecifico (per esempio bispecifico).

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un sdAb anti-CD38 comprendente le regioni CDR di una qualsiasi di SEQ ID NO: 89-100. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD38 comprende uno qualsiasi di quanto segue:

- (1) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:40; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:52; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:64;
- (2) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:41; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:53; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:65;
- (3) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:42; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:54; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:66;
- (4) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:43; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:55; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:67;
- (5) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:44; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:56; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:68;
- (6) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:45; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:57; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:69;
- (7) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:46; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:58; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:70;
- (8) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:47; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:59; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:71;
- (9) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:48; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:60; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:72;
- (10) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:49; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:61; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:73;
- (11) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:50; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:62; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:74; o
- (12) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:51; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:63; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:75.

In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD38 comprende un dominio V_HH comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO:89-100.

Viene presentato come riferimento un anticorpo a sola catena pesante (HCAB) anti-BCMA o una proteina legante l'antigene comprendente uno qualsiasi degli sdAb anti-BCMA descritti sopra.

Una forma di realizzazione della presente invenzione fornisce un recettore antigenico chimerico CD38 dell'invenzione comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD38 (come uno qualsiasi degli sdAb anti-CD38 descritti sopra); (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, il CAR è monospecifico. Il CAR può essere descritto come multivalente (per esempio bivalente o trivalente). In alcune forme di realizzazione, il CAR è multispecifico (per esempio bispecifico).

Una forma di realizzazione della presente invenzione fornisce un recettore antigenico chimerico CD22 dell'invenzione comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD22; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, il CAR è monospecifico. Il CAR può essere descritto come multivalente (per esempio bivalente o trivalente). In alcune forme di realizzazione, il CAR è multispecifico (per esempio bispecifico).

La presente invenzione fornisce un recettore antigenico chimerico (CAR) comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un primo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente a un primo antigene e un secondo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente a un secondo antigene, in cui ciascuno tra il primo e il secondo sdAb è un V_HH; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è localizzato in corrispondenza del terminale N del secondo sdAb. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è localizzato in corrispondenza del terminale C del secondo sdAb.

In alcune forme di realizzazione secondo uno qualsiasi dei CAR forniti sopra, il primo antigene e il secondo antigene sono selezionati dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è un sdAb anti-BCMA, come uno qualsiasi degli sdAb anti-BCMA descritti sopra. In alcune forme di realizzazione, il CAR comprende un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente almeno due copie (come 2, 3 o più copie) di un sdAb anti-BCMA. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è un sdAb anti-CD19, come uno qualsiasi degli sdAb anti-CD19 descritti sopra. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è un sdAb anti-CD20, come uno qualsiasi degli sdAb anti-CD20 descritti sopra. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è un sdAb anti-CD38, come uno qualsiasi degli sdAb anti-CD38 descritti sopra. In alcune forme di

realizzazione, il CAR comprende un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente almeno due copie (come 2, 3 o più copie) di un sdAb anti-CD38. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è un sdAb anti-CD22.

In alcune forme di realizzazione secondo uno qualsiasi dei CAR forniti sopra, il primo antigene è diverso dal secondo antigene. In alcune forme di realizzazione, il CAR è multispecifico, per esempio bispecifico. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è un sdAb anti-BCMA e il secondo sdAb è un sdAb anti-CD38. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è un sdAb anti-BCMA e il secondo sdAb è un sdAb anti-CD19. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è un sdAb anti-CD19 e il secondo sdAb è un sdAb anti-CD20. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è un sdAb anti-CD19 e il secondo sdAb è un sdAb anti-CD22.

In alcune forme di realizzazione secondo uno qualsiasi dei CAR monospecifici forniti sopra, il primo antigene è identico al secondo antigene. In alcune forme di realizzazione, il CAR è bivalente o trivalente. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb e il secondo sdAb si legano specificamente allo stesso epitopo. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è identico al secondo sdAb. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb e il secondo sdAb si legano specificamente a epitopi diversi.

In alcune forme di realizzazione, secondo uno dei CAR forniti sopra, il primo sdAb e/o il secondo sdAb sono camelidi, chimerici o umanizzati.

In alcune forme di realizzazione, secondo uno dei CAR forniti sopra, il primo sdAb e il secondo sdAb sono direttamente fusi l'uno all'altro attraverso un legame peptidico. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb e il secondo sdAb sono fusi l'uno all'altro tramite un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi.

In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO: 144-151.

In alcune forme di realizzazione di uno qualsiasi dei CAR (inclusi CAR CD19, CAR CD20, CAR BCMA, CAR CD38 e CAR CD22) forniti sopra, il dominio transmembrana è derivato da una molecola selezionata dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1.

In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana deriva da CD8 o CD28. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 132 o SEQ ID NO: 133.

In alcune forme di realizzazione di un qualsiasi CAR (inclusi CAR CD19, CAR CD20, CAR BCMA, CAR CD38 e CAR CD22) forniti sopra, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 140 o SEQ ID NO: 141.

In alcune forme di realizzazione secondo uno qualsiasi dei CAR (inclusi CAR CD19, CAR CD20, CAR BCMA, CAR CD38 e CAR CD22) forniti

sopra, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria comprende un dominio citoplasmatico di CD28 e/o un dominio citoplasmatico di CD137. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 136 e/o SEQ ID NO: 137.

In alcune forme di realizzazione secondo uno qualsiasi dei CAR (inclusi CAR CD19, CAR CD20, CAR BCMA, CAR CD38 e CAR CD22) forniti sopra, il CAR comprende inoltre un dominio cerniera localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare legante l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera è derivato da CD8 α . In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 130.

In alcune forme di realizzazione, il CAR comprende anche un peptide segnale localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il peptide segnale è derivato da una molecola selezionata dal gruppo costituito da CD8 α , recettore α del GM-CSF e catena pesante IgG1. In alcune forme di realizzazione, il peptide segnale è derivato da CD8 α . In alcune forme di realizzazione, il peptide segnale comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 127.

Un aspetto della presente invenzione fornisce un recettore antigenico chimerico di uno qualsiasi di quelli elencati nelle Tabelle 5 e 6. I CAR elencati nella Tabella 4 sono qui presentati come riferimento.

Un aspetto della presente invenzione fornisce un CAR comprendente un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 76-100, 198-201, 206-216 e 265-270.

Un aspetto della presente invenzione fornisce un acido nucleico isolato comprendente una sequenza di acido nucleico codificante uno qualsiasi dei CAR (inclusi i CAR CD19, CAR CD20, CAR BCMA, CAR CD38 e CAR CD22) forniti sopra. In alcune forme di realizzazione, la sequenza di acido nucleico è selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 202-205, 217-227 e 271-276. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato comprende anche una seconda sequenza di acido nucleico che codifica un secondo CAR, in cui la sequenza di acido nucleico che codifica il CAR è operativamente legata alla seconda sequenza di acido nucleico attraverso una terza sequenza di acido nucleico che codifica un peptide auto-clivabile, come un peptide T2A, P2A o F2A. In alcune forme di realizzazione, la terza sequenza di acido nucleico è SEQ ID NO: 256. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è una molecola di DNA. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è una molecola di RNA.

Un aspetto della presente invenzione prevede un vettore che comprende gli acidi nucleici isolati dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, il

vettore è un vettore di espressione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore virale. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore lentivirale.

Un aspetto della presente invenzione prevede una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata, comprendente uno qualsiasi dei CAR (inclusi CAR CD19, CAR CD20, CAR BCMA, CAR CD38 e CAR CD22) forniti sopra o uno qualsiasi degli acidi nucleici isolati dell'invenzione, o uno qualsiasi dei vettori dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata comprende o esprime due o più CAR (inclusi CAR CD19, CAR CD20, CAR BCMA, CAR CD38 e CAR CD22) forniti sopra, dove i due o più CAR si legano specificamente ad antigeni diversi. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria è una cellula T, una cellula NK, una cellula mononucleata di sangue periferico (PBMC), una cellula staminale ematopoietica, una cellula staminale pluripotente o una cellula staminale embrionale. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria è una cellula T.

Un aspetto della presente invenzione prevede una composizione farmaceutica che comprende una qualsiasi delle cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate dell'invenzione e un carrier farmaceuticamente accettabile. Inoltre, il composto farmaceutico dell'invenzione può essere utilizzato in un metodo di trattamento del cancro in un individuo. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogena. In alcune forme di realizzazione, il tumore è un tumore liquido. In alcune forme di realizzazione, il tumore è mieloma multiplo, leucemia linfoblastica acuta o leucemia linfocitica cronica. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un tumore solido, come il glioblastoma.

Viene presentata come riferimento una composizione farmaceutica comprendente uno qualsiasi degli sdAb anti-CD19, sdAb anti-CD20, sdAb anti-CD38 o sdAb anti-BCMA sopra descritti e un carrier farmaceuticamente accettabile. In alcuni esempi, esiste un metodo per trattare una malattia (come il cancro) in un individuo, che comprende la somministrazione all'individuo di una quantità efficace della composizione farmaceutica.

Sono previsti anche kit d'uso e articoli di fabbricazione che comprendono uno qualsiasi dei CAR, delle cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate, degli acidi nucleici isolati o dei vettori dell'invenzione. L'invenzione è definita nel set di rivendicazioni allegato. Le forme di realizzazione e/o gli esempi della seguente descrizione che non sono coperti dalle rivendicazioni allegate non sono considerati parte della presente invenzione. Tutti i riferimenti ai metodi di trattamento contenuti nella descrizione si riferiscono ai composti, alle composizioni farmaceutiche e ai medicinali della presente invenzione da utilizzare in un metodo per il trattamento del corpo umano (o animale) mediante terapia (o per la diagnosi).

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La FIGURA 1A confronta le strutture di un CAR basato su V_HH e di un CAR convenzionale basato su scFv. La struttura schematica a sinistra mostra

un CAR monovalente monospecifico esemplificativo con un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un dominio V_{HH} . La struttura schematica a destra mostra un CAR monovalente monospecifico esemplificativo con un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un dominio scFv.

La FIGURA 1B confronta le strutture di un CAR basato su V_{HH} con due siti di legame con l'antigene e di un CAR convenzionale basato su scFv con due siti di legame con l'antigene. La struttura schematica a sinistra è un CAR esemplificativo con un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende due domini V_{HH} . I due domini V_{HH} possono essere uguali o diversi. La struttura schematica a destra mostra un CAR esemplificativo con un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente due domini scFv. I due domini scFv possono essere uguali o diversi.

La FIGURA 1C mostra le strutture schematiche di CAR bivalenti e bispecifici esemplificativi basati su V_{HH} . La struttura schematica nel riquadro in alto a sinistra mostra un CAR monospecifico e bivalente esemplificativo con un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende due domini V_{HH} identici, ciascuno dei quali si lega specificamente all'epitopo 1 dell'antigene A. La struttura schematica nel riquadro in alto a destra mostra un CAR monospecifico e bivalente esemplificativo avente un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un primo dominio V_{HH} che si lega specificamente all'epitopo 1 dell'antigene A e un secondo dominio V_{HH} che si lega specificamente all'epitopo 2 dell'antigene A. L'epitopo 1 e l'epitopo 2 dell'antigene A possono essere diversi nelle loro strutture e/o sequenze. La struttura schematica nel riquadro in basso a sinistra mostra un CAR bispecifico esemplificativo con un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un primo dominio V_{HH} che si lega specificamente all'antigene A e un secondo dominio V_{HH} che si lega specificamente all'antigene B. L'antigene A e l'antigene B sono antigeni diversi.

La FIGURA 1D mostra le strutture schematiche di CAR esemplificativi basati su V_{HH} con tre o più domini V_{HH} . I CAR possono avere una pluralità di domini V_{HH} fusi tra loro direttamente o tramite linker peptidici. I domini V_{HH} possono essere uguali o diversi. Domini V_{HH} diversi possono legarsi specificamente a epitopi diversi sullo stesso antigene o su antigeni diversi.

La FIGURA 1E mostra un esempio di cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate che coesprimono due diversi CAR basati su V_{HH} . La cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata esemplificativa nel riquadro a sinistra coesprime due diversi CAR monospecifici e monovalenti. La cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata esemplificativa nel riquadro centrale coesprime un CAR monospecifico, monovalente e un CAR bispecifico o bivalente. La cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata esemplificativa nel riquadro a destra coesprime due diversi CAR bispecifici o bivalenti. I CAR possono riconoscere antigeni diversi.

La FIGURA 2A mostra i risultati di un saggio di citotossicità *in vitro* di cellule T che esprimono CAR monospecifici esemplificativi comprendenti vari anticorpi a dominio singolo anti-BCMA (*vale a dire* anti-CD269) o anti-CD38 contro la linea cellulare di mieloma multiplo RPMI8226.Luc.

La FIGURA 2B mostra i risultati di un saggio di citotossicità *in vitro* di cellule T che esprimono CAR monospecifici esemplificativi comprendenti vari anticorpi a dominio singolo anti-BCMA (*vale a dire* anti-CD269) o anti-CD38 contro la linea cellulare di glioblastoma U87MG.Luc.

La FIGURA 3A mostra i risultati di un test di citotossicità *in vitro* di cellule T che esprimono CAR bispecifici esemplificativi contro la linea cellulare di mieloma multiplo RPMI8226.Luc.

La FIGURA 3B mostra i risultati di un test di citotossicità *in vitro* di cellule T che esprimono CAR bispecifici esemplificativi contro la linea cellulare di mieloma multiplo RPMI8226.Luc.

La FIGURA 4 mostra i risultati di un saggio di citotossicità *in vitro* di cellule T che esprimono CAR bispecifici esemplificativi contro la linea cellulare di mieloma multiplo RPMI8226.Luc.

La FIGURA 5 mostra i costrutti di un CAR bispecifico esemplificativo mirato a CD19 e CD20, un CAR monospecifico esemplificativo mirato a CD19 e un CAR monospecifico esemplificativo mirato a CD20.

La FIGURA 6 mostra i risultati di un saggio di citotossicità *in vitro* per diverse cellule T. Il riquadro in alto a sinistra mostra i risultati delle cellule T di controllo non trasdotte. Il riquadro in alto a destra mostra i risultati delle cellule T che esprimono un CAR CD19 esemplificativo. Il riquadro in basso a sinistra mostra i risultati delle cellule T che esprimono un CAR CD20 esemplificativo. Il riquadro in basso a destra mostra i risultati delle cellule T che esprimono un CAR bispecifico CD19 × CD20 esemplificativo.

La FIGURA 7 mostra i risultati di un saggio antitumorale *in vivo* di cellule T che esprimono un CAR bispecifico esemplificativo mirato a CD19 e CD20.

La FIGURA 8A mostra i risultati di un saggio di citotossicità *in vitro* di cellule T che esprimono CAR monospecifici e bivalenti esemplificativi contro la linea cellulare di mieloma multiplo RPMI8226.Luc. I CAR comprendono ciascuno un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende due diversi sdAb anti-BCMA (*vale a dire* anti-CD269).

La FIGURA 8B mostra i risultati di un saggio di citotossicità *in vitro* di cellule T che esprimono CAR monospecifici e bivalenti esemplificativi contro la linea cellulare di glioblastoma U87MG.Luc. I CAR comprendono ciascuno un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende due diversi sdAb anti-BCMA (*vale a dire* anti-CD269).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELLA PRESENTE INVENZIONE

La presente invenzione fornisce recettori antigenici chimerici monospecifici, multispecifici (per esempio bispecifici) e multivalenti (per esempio bivalenti o trivalenti) comprendenti domini extracellulari di legame con l'antigene basati su anticorpi a dominio singolo (sdAb) come definito nelle

rivendicazioni. A differenza dei frammenti di legame con l'antigene derivati dagli anticorpi convenzionali a quattro catene, gli sdAb contengono solo un dominio singolo variabile, come V_HH. Pertanto, gli sdAb hanno dimensioni molto più ridotte rispetto ai frammenti di legame con l'antigene, come gli scFv, attualmente utilizzati come domini extracellulari di legame con l'antigene nei CAR. Inoltre, poiché non è necessario l'appaiamento della catena pesante e della catena leggera durante il ripiegamento degli sdAb, il ripiegamento errato del dominio extracellulare di legame con l'antigene può essere ridotto nelle cellule immunitarie ingegnerizzate che esprimono i CAR basati sugli sdAb. I CAR con domini extracellulari leganti l'antigene che comprendono copie multiple di un sdAb o più sdAb che mirano a epitopi o antigeni diversi possono essere comodamente costruiti e prodotti in modo ricombinante, fornendo così una piattaforma efficiente per la preparazione e lo screening di CAR multivalenti e multispecifici. Inoltre, l'ingombro ridotto degli sdAb può consentire l'accesso dei CAR a target antigenici ed epitopi nascosti nei tessuti tumorali.

I CAR multispecifici e multivalenti possono avere un'efficacia migliore rispetto ai CAR monovalenti monospecifici per l'immunoterapia del cancro. Le cellule tumorali sono geneticamente instabili, il che consente loro di sfuggire alle terapie mirate mutando o perdendo i geni che codificano gli antigeni target. Mirando a due o più epitopi o antigeni diversi sulle cellule tumorali, i CAR multivalenti o multispecifici possono rendere più difficile per le cellule tumorali sfuggire completamente al target delle cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate (come le cellule T) che esprimono i CAR. Grazie alle loro dimensioni ridotte, gli anticorpi a dominio singolo fusi in tandem, utilizzati come domini extracellulari di legame con l'antigene nei CAR multivalenti o multispecifici della presente invenzione, possono conservare la loro integrità strutturale individuale e l'affinità di legame con gli antigeni target, consentendo così un efficace targeting di ciascun epitopo o antigene da parte dei CAR. Le cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate che esprimono i CAR multivalenti o multispecifici o che coesprimono due o più recettori antigenici chimerici che mirano a diversi antigeni tumorali possono superare i meccanismi di fuga immunitaria del tumore dovuti ad anomalie nel processamento e nella presentazione delle proteine-antigene. Di conseguenza, un aspetto della presente invenzione fornisce un recettore antigenico chimerico (CAR) multispecifico (ad esempio bispecifico) comprendente un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un primo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente a un primo antigene e un secondo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente a un secondo antigene, in cui ciascuno tra il primo e il secondo sdAb è un VHH; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, dove il primo antigene è diverso dal secondo antigene. In alcune forme di realizzazione, il primo antigene è BCMA e il secondo antigene è CD38. In alcune forme di realizzazione, il primo antigene è il CD19 e il secondo antigene è il BCMA. In alcune forme di realizzazione, il primo antigene è CD19 e il secondo antigene è CD20. In alcune forme di realizzazione, il primo antigene è CD19 e il secondo antigene è CD22.

In un altro aspetto, è fornito un recettore antigenico chimerico multivalente (CAR) costituito da un polipeptide che comprende: (a) un dominio

extracellulare di legame con l'antigene che comprende un primo e un secondo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente a un antigene, in cui ciascuno tra il primo e il secondo sdAb è un VHH; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare.

In un altro aspetto, viene fornito un recettore chimerico multivalente dell'antigene (CAR) dell'invenzione comprendente un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un primo anticorpo a dominio singolo che si lega specificamente a un primo epitopo di un antigene e un secondo anticorpo a dominio singolo che si lega specificamente a un secondo epitopo dell'antigene; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, dove il primo epitopo è diverso dal secondo epitopo.

Sono stati inoltre presentati come riferimento nuovi anticorpi a dominio singolo anti-CD19, anti-CD20, anti-BCMA e anti-CD38 e recettori antigenici chimerici che comprendono uno qualsiasi degli sdAb.

Vengono inoltre fornite cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate (come le cellule T) che comprendono i CAR dell'invenzione, composizioni farmaceutiche dell'invenzione e la composizione farmaceutica dell'invenzione da utilizzare nei metodi di trattamento del cancro.

I. Definizioni

La pratica della presente invenzione si avvarrà, a meno che non sia indicato specificamente il contrario, di metodi convenzionali di virologia, immunologia, microbiologia, biologia molecolare e tecniche di DNA ricombinante che rientrano nelle competenze della tecnica, molti dei quali sono descritti di seguito a scopo illustrativo. Tali tecniche sono spiegate in modo esauriente in letteratura. Vedere, *ad esempio*, Current Protocols in Molecular Biology o Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (2009)); Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, 3^a ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook e Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3a edizione, 2001); Maniatis *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, ed., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, ed., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) e altri riferimenti bibliografici simili.

Il termine "anticorpo" comprende gli anticorpi monoclonali (compresi gli anticorpi a 4 catene complete o gli anticorpi a catena pesante completa che hanno una regione Fc dell'immunoglobulina), le composizioni di anticorpi con specificità poliepitopica, gli anticorpi multispecifici (*ad esempio*, gli anticorpi bispecifici, i diacorpi e le molecole a catena singola) e i frammenti di anticorpi (*ad esempio*, Fab, F(ab')₂, e Fv). Il termine "immunoglobulina" (Ig) viene qui utilizzato in modo intercambiabile con "anticorpo". Gli anticorpi qui contemplati includono anticorpi a dominio singolo, come gli anticorpi che contengono solo la catena pesante.

L'unità anticorpale di base a 4 catene è una glicoproteina eterotetramerica composta da due catene leggere (L) e due catene pesanti (H) identiche. Un

anticorpo IgM è costituito da 5 unità di base dell'eterotetramero insieme a un polipeptide aggiuntivo chiamato catena J e contiene 10 siti di legame con l'antigene, mentre gli anticorpi IgA comprendono da 2 a 5 unità di base a 4 catene che possono polimerizzare per formare assemblaggi polivalenti in combinazione con la catena J. Nel caso delle IgG, l'unità a 4 catene è generalmente di circa 150.000 dalton. Ogni catena L è legata a una catena H da un legame disolfuro covalente, mentre le due catene H sono legate tra loro da uno o più legami disolfuro a seconda dell'isotipo della catena H. Ciascuna catena H e L presenta inoltre ponti disolfuro intracatena regolarmente distanziati. Ogni catena H presenta al terminale N un dominio variabile (V_H) seguito da tre domini costanti (C_H) per ciascuna delle catene α e γ e da quattro domini C_H per gli isotipi μ ed ϵ . Ogni catena L presenta al terminale N un dominio variabile (V_L) seguito da un dominio costante all'altra estremità. Il V_L è allineato con il V_H e il C_L è allineato con il primo dominio costante della catena pesante (C_H1). Si ritiene che particolari residui amminoacidici formino un'interfaccia tra i domini variabili della catena leggera e della catena pesante. L'accoppiamento di un V_H e V_L forma un singolo sito di legame con l'antigene. Per la struttura e le proprietà delle diverse classi di anticorpi, vedere *ad esempio*, *Basic and Clinical Immunology*, 8a edizione, Daniel P. Sties, Abba I. Terr e Tristram G. Parslow (ed.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, pagina 71 e Capitolo 6. La catena L di qualsiasi specie vertebrata può essere assegnata a uno dei due tipi chiaramente distinti, chiamati kappa e lambda, in base alle sequenze amminoacidiche dei loro domini costanti. In base alla sequenza amminoacidica del dominio costante delle loro catene pesanti (C_H), le immunoglobuline possono essere assegnate a diverse classi o isotipi. Esistono cinque classi di immunoglobuline: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, con catene pesanti denominate rispettivamente α , δ , ϵ , γ e μ . Le classi γ e α sono ulteriormente suddivise in sottoclassi sulla base di differenze relativamente minori nella sequenza e nella funzione dei C_H ; *ad esempio*, gli esseri umani esprimono le seguenti sottoclassi: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

Il termine "anticorpo a sola catena pesante" o "HCAb" si riferisce a un anticorpo funzionale che comprende catene pesanti, ma non le catene leggere solitamente presenti negli anticorpi a 4 catene. Gli animali camelidi (come cammelli, lama o alpaca) sono noti per produrre HCAb.

Il termine "anticorpo a dominio singolo" o "sdAb" si riferisce a un singolo polipeptide che lega l'antigene e che ha tre regioni determinanti complementari (CDR). L'sdAb da solo è in grado di legarsi all'antigene senza accoppiarsi con il corrispondente polipeptide contenente CDR. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi a dominio singolo sono ingegnerizzati a partire da HCAb di camelidi e i loro domini variabili della catena pesante sono qui indicati come " V_{HH} ". Alcuni V_{HH} possono anche essere conosciuti come nano-corpi. L'sdAb dei camelidi è uno dei più piccoli frammenti di anticorpi legati all'antigene conosciuti (vedere, *ad esempio*, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-8 (1993); Greenberg *et al.*, *Nature* 374:168-73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, *Nanomedicine (Lond)*, 8:1013-26 (2013)). Un V_{HH} di base ha la seguente struttura dal terminale N al terminale C: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, in cui FR1 a FR4 si riferiscono rispettivamente alle regioni quadro da 1 a 4, e in cui CDR1 a

CDR3 si riferiscono alle regioni determinanti la complementarità da 1 a 3.

Un anticorpo "isolato" è un anticorpo che è stato identificato, separato e/o recuperato da un componente del suo ambiente di produzione (*ad esempio*, naturale o ricombinante). Preferibilmente, il polipeptide isolato è privo di associazione con tutti gli altri componenti del suo ambiente di produzione. I componenti contaminanti del suo ambiente di produzione, come quello derivante da cellule ricombinanti trasfettate, sono materiali che tipicamente interferiscono con gli usi di ricerca, diagnostici o terapeutici dell'anticorpo e possono includere enzimi, ormoni e altri soluti proteici o non proteici. Negli incarichi preferiti, il polipeptide sarà purificato: (1) a più del 95% in peso dell'anticorpo come determinato, ad esempio, dal metodo Lowry e, in alcune forme di realizzazione, a più del 99% in peso; (1) a un grado sufficiente per ottenere almeno 15 residui di sequenza amminoacidica terminale N o interna mediante l'uso di un sequenziatore a tazza rotante, o (3) all'omogeneità mediante SDS-PAGE in condizioni non riducenti o riducenti utilizzando il blu di Coomassie o, preferibilmente, la colorazione d'argento. L'anticorpo isolato comprende l'anticorpo in situ all'interno di cellule ricombinanti, poiché almeno un componente dell'ambiente naturale dell'anticorpo non sarà presente. In genere, tuttavia, un polipeptide o un anticorpo isolato viene preparato con almeno una fase di purificazione.

La "regione variabile" o "dominio variabile" di un anticorpo si riferisce ai domini ammino-terminali della catena pesante o leggera dell'anticorpo. I domini variabili della catena pesante e della catena leggera possono essere denominati rispettivamente "V_H" e "V_L". Questi domini sono generalmente le parti più variabili dell'anticorpo (rispetto ad altri anticorpi della stessa classe) e contengono i siti di legame con l'antigene. Gli anticorpi a catena pesante delle specie camelidi hanno una sola regione variabile della catena pesante, denominata "V_HH". Il V_HH è quindi un tipo speciale di V_H.

Il termine "variabile" si riferisce al fatto che alcuni segmenti dei domini variabili differiscono ampiamente nella sequenza tra gli anticorpi. Il dominio V media il legame con l'antigene e definisce la specificità di un particolare anticorpo per il suo particolare antigene. Tuttavia, la variabilità non è distribuita in modo uniforme sull'intero arco dei domini delle variabili. Si concentra invece in tre segmenti chiamati regioni ipervariabili (HVR) sia nella catena leggera che nei domini variabili della catena pesante. Le porzioni più altamente conservate dei domini variabili sono chiamate regioni quadro (FR). I domini variabili delle catene pesanti e leggere native comprendono ciascuno quattro regioni FR, che adottano in gran parte una configurazione beta-sheet, collegate da tre HVR, che formano loop che collegano la, e in alcuni casi fanno parte della, struttura beta-sheet. Le HVR di ciascuna catena sono tenute insieme in stretta vicinanza dalle regioni FR e, con le HVR dell'altra catena, contribuiscono alla formazione del sito di legame con l'antigene degli anticorpi (vedere Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, Quinta edizione, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). I domini costanti non sono coinvolti direttamente nel legame dell'anticorpo con l'antigene, ma presentano varie funzioni effettrici, come la partecipazione dell'anticorpo alla tossicità cellulare anticorpo-dipendente.

Il termine "anticorpo monoclonale", come qui utilizzato, si riferisce a un anticorpo ottenuto da una popolazione di anticorpi sostanzialmente omogenei, vale a dire che i singoli anticorpi che compongono la popolazione sono identici, ad eccezione di possibili mutazioni naturali e/o modifiche post-traduzionali (*ad esempio*, isomerizzazioni, ammidazioni) che possono essere presenti in quantità minori. Gli anticorpi monoclonali sono altamente specifici, essendo diretti contro un singolo sito antigenico. A differenza delle preparazioni di anticorpi policlonali, che in genere includono diversi anticorpi diretti contro diversi determinanti (epitopi), ogni anticorpo monoclonale è diretto contro un singolo determinante dell'antigene. Oltre alla loro specificità, gli anticorpi monoclonali presentano il vantaggio di essere sintetizzati dalla coltura dell'ibridoma o in modo ricombinante, non contaminati da altre immunoglobuline. Il modificatore "monoclonale" indica che l'anticorpo è stato ottenuto da una popolazione sostanzialmente omogenea di anticorpi e non deve essere interpretato come una richiesta di produzione dell'anticorpo con un metodo particolare. Ad esempio, gli anticorpi monoclonali da utilizzare in conformità alla presente invenzione possono essere realizzati con diverse tecniche, tra cui, ad esempio, il metodo dell'ibridoma (*ad esempio*, Kohler e Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975)); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), metodi di DNA ricombinante (vedere, *ad esempio*, il Brevetto U.S. n. 4,816,567), tecnologie di visualizzazione dei fagi (vedere, *ad esempio*, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); e Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), e le tecnologie per la produzione di anticorpi umani o simili a quelli umani in animali che hanno parti o tutti i loci di immunoglobuline umane o geni che codificano sequenze di immunoglobuline umane (vedere, *ad esempio* WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); i Brevetti U.S. n. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; e 5,661,016; Marks *et al.*, *BioTechnology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Il termine "anticorpo nudo" si riferisce a un anticorpo che non è coniugato a una parte citotossica o a un radiomarcatore.

I termini "anticorpo completo", "anticorpo intatto" o "anticorpo intero" sono usati in modo intercambiabile per indicare un anticorpo nella sua forma sostanzialmente intatta, in contrapposizione a un frammento di anticorpo. In particolare, gli anticorpi a 4 catene complete comprendono quelli con catene pesanti e leggere che includono una regione Fc. Gli anticorpi a catena pesante completa comprendono solo la catena pesante (come il V_HH) e

una regione Fc. I domini costanti possono essere domini costanti di sequenza nativa (*ad esempio*, domini costanti di sequenza nativa umana) o loro varianti di sequenza amminoacidica. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo intatto può avere una o più funzioni effettrici.

Un "frammento di anticorpo" comprende una porzione di un anticorpo intatto, preferibilmente la regione legante l'antigene e/o la regione variabile dell'anticorpo intatto. Esempi di frammenti di anticorpi includono frammenti Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv; diacorpi; anticorpi lineari (vedere il Brevetto U.S. n. 5,641,870, Esempio 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); molecole anticorpali a catena singola; anticorpi a dominio singolo (come il V_HH) e anticorpi multispecifici formati da frammenti di anticorpi. La digestione con papaina degli anticorpi produce due frammenti identici che legano l'antigene, chiamati frammenti "Fab", e un frammento "Fc" residuo, una denominazione che riflette la capacità di cristallizzare facilmente.

Il frammento Fab è costituito da un'intera catena L insieme al dominio della regione variabile della catena H (V_H) e al primo dominio costante di una catena pesante (C_{H1}). Ogni frammento Fab è monovalente rispetto al legame con l'antigene, vale a dire che ha un singolo sito di legame con l'antigene.

Il trattamento con pepsina di un anticorpo produce un singolo frammento F(ab')₂ di grandi dimensioni che corrisponde approssimativamente a due frammenti Fab legati al disolfuro con diversa attività di legame con l'antigene, ma che è ancora in grado di legare l'antigene. I frammenti Fab' differiscono dai frammenti Fab per la presenza di alcuni residui aggiuntivi alla terminazione carbossilica del dominio C_{H1}, tra cui una o più cisteine della regione cerniera dell'anticorpo. Fab'-SH è la denominazione qui riportata per Fab' in cui i residui di cisteina dei domini costanti presentano un gruppo tiolico libero. I frammenti di anticorpi F(ab')₂ sono stati originariamente prodotti come coppie di frammenti Fab' che presentano cisteine cerniera tra loro. Sono noti anche altri accoppiamenti chimici di frammenti di anticorpi.

Il frammento Fc comprende le porzioni carbossi-terminali di entrambe le catene H tenute insieme da disolfuri. Le funzioni effettrici degli anticorpi sono determinate dalle sequenze della regione Fc, che viene riconosciuta anche dai recettori Fc (FcR) presenti in alcuni tipi di cellule.

"Fv" è il frammento minimo di anticorpo che contiene un sito completo di riconoscimento e legame con l'antigene. Questo frammento consiste in un dimero di un dominio della regione variabile della catena pesante e di quella leggera in stretta associazione non covalente. Dal ripiegamento di questi due domini derivano sei loop ipervariabili (3 loop ciascuno dalla catena H e L) che contribuiscono ai residui amminoacidici per il legame con l'antigene e conferiscono all'anticorpo la specificità del legame con l'antigene. Tuttavia, anche un dominio singolo variabile (o la metà di un Fv che comprende solo tre HVR specifici per un antigene) ha la capacità di riconoscere e legare l'antigene, sebbene con un'affinità inferiore rispetto all'intero sito di legame.

I "Fv a catena singola", abbreviati anche come "sFv" o "scFv", sono frammenti di anticorpi che comprendono i domini anticorpali V_H e V_L collegati in una singola catena polipeptidica. Preferibilmente, il polipeptide sFv comprende anche un linker polipeptidico tra i domini V_H e V_L che consente al

sFv di formare la struttura desiderata per il legame con l'antigene. Per una rassegna dell'sFv, vedere Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore ed., Springer-Verlag, New York, pagg. 269-315 (1994)).

I "frammenti funzionali" degli anticorpi qui descritti comprendono una porzione di un anticorpo intatto, che generalmente include la regione variabile o legante l'antigene dell'anticorpo intatto o la regione Fc di un anticorpo che conserva o ha modificato la capacità di legare l'FcR. Esempi di frammenti di anticorpi includono anticorpi lineari, molecole di anticorpi a catena singola e anticorpi multispecifici formati da frammenti di anticorpi.

Il termine "diacorpi" si riferisce a piccoli frammenti di anticorpi preparati costruendo frammenti di sFv (si veda il paragrafo precedente) con brevi linker (circa 5-10 residui) tra i domini V_H e V_L in modo da ottenere un accoppiamento tra le catene ma non all'interno delle catene dei domini V, ottenendo così un frammento bivalente, *vale a dire* un frammento con due siti di legame con l'antigene. I diacorpi bispecifici sono eterodimeri di due frammenti sFv "crossover" in cui i domini V_H e V_L dei due anticorpi sono presenti su catene polipeptidiche diverse. I diacorpi sono descritti in modo più dettagliato, ad esempio, in, EP 404.097; WO 93/11161; Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993).

Gli anticorpi monoclonali qui presenti includono specificamente anticorpi "chimerici" (immunoglobuline) in cui una parte della catena pesante e/o leggera è identica o omologa a sequenze corrispondenti in anticorpi derivati da una particolare specie o appartenenti a una particolare classe o sottoclasse di anticorpi, mentre il resto della/e catena/e è identico o omologo a sequenze corrispondenti in anticorpi derivati da un'altra specie o appartenenti a un'altra classe o sottoclasse di anticorpi, nonché a frammenti di tali anticorpi, purché presentino l'attività biologica desiderata (Brevetto U.S. n. 4,816,567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Gli anticorpi chimerici di interesse includono gli anticorpi PRIMATTZFD® in cui la regione legante l'antigene dell'anticorpo deriva da un anticorpo prodotto, *ad esempio*, immunizzando scimmie macaco con un antigene di interesse. Nel presente documento, con "anticorpo umanizzato" si intende un sottoinsieme di "anticorpi chimerici".

Le forme "umanizzate" di anticorpi non umani (*ad esempio*, camelidi) sono anticorpi chimerici che contengono una sequenza minima derivata da immunoglobuline non umane. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo umanizzato è un'immunoglobulina umana (anticorpo ricevente) in cui i residui di un HVR (di seguito definito) del ricevente sono sostituiti da residui di un HVR di una specie non umana (anticorpo donatore), come il topo, il ratto, il coniglio o il primate non umano, con la specificità, l'affinità e/o la capacità desiderate. In alcune forme di realizzazione, i residui di struttura ("FR") dell'immunoglobulina umana sono sostituiti da corrispondenti residui non umani. Inoltre, gli anticorpi umanizzati possono comprendere residui che non si trovano nell'anticorpo ricevente o nell'anticorpo donatore. Queste modifiche possono essere apportate per perfezionare ulteriormente le prestazioni dell'anticorpo, come l'affinità di legame. In generale, un anticorpo umanizzato comprende sostanzialmente tutti almeno uno, e in genere due, domini variabili, in cui tutte o quasi tutte le anse ipervariabili corrispondono a quelle di una sequenza di immunoglobuline non umane e tutte o

quasi tutte le regioni FR sono quelle di una sequenza di immunoglobuline umane, sebbene le regioni FR possano includere una o più sostituzioni di singoli residui FR che migliorano le prestazioni dell'anticorpo, come l'affinità di legame, l'isomerizzazione, l'immunogenicità, eccetera. Il numero di queste sostituzioni amminoacidiche nella FR non è in genere superiore a 6 nella catena H e a 3 nella catena L. L'anticorpo umanizzato comprenderà facoltativamente anche almeno una porzione di una regione costante dell'immunoglobulina (Fc), tipicamente quella di un'immunoglobulina umana. Per ulteriori dettagli, vedere, *ad esempio*, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Vedere anche, *ad esempio*, Vaswani e Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle e Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); e i Brevetti U.S. n. 6982321 e 7087409.

Un "anticorpo umano" è un anticorpo che possiede una sequenza amminoacidica corrispondente a quella di un anticorpo prodotto da un essere umano e/o che è stato prodotto utilizzando una qualsiasi delle tecniche di produzione di anticorpi umani qui descritte. Questa definizione di anticorpo umano esclude specificamente un anticorpo umanizzato che comprende residui non umani che legano l'antigene. Gli anticorpi umani possono essere prodotti con varie tecniche note nella tecnica, tra cui le librerie di visualizzazione dei fagi. Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Per la preparazione di anticorpi monoclonali umani sono disponibili anche i metodi descritti in Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Vedere anche van Dijk e van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Gli anticorpi umani possono essere preparati somministrando l'antigene a un animale transgenico che è stato modificato per produrre tali anticorpi in risposta alla stimolazione antigenica, ma i cui loci endogeni sono stati disattivati, *ad esempio* xenomici immunizzati (vedere, *ad esempio*, i Brevetti U.S. n. 6,075,181 e 6,150,584 riguardanti la tecnologia XENOMOUSE™). Vedere anche, *ad esempio*, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)) sugli anticorpi umani generati attraverso la tecnologia dell'ibridoma di cellule B umane.

Il termine "regione ipervariabile", "HVR" o "HV", quando viene utilizzato nel presente documento, si riferisce alle regioni di un dominio variabile dell'anticorpo che sono ipervariabili in sequenza e/o formano anelli strutturalmente definiti. In genere, gli anticorpi a dominio singolo comprendono tre HVR (o CDR): HVR1 (o CDR1), HVR2 (o CDR2) e HVR3 (o CDR3). L'HVR3 presenta la maggiore diversità dei tre HVR e si ritiene che svolga un ruolo unico nel conferire una fine specificità agli anticorpi. Vedere, *ad esempio*, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

I termini "regione determinante la complementarità" o "CDR" sono utilizzati per indicare le regioni ipervariabili definite dal sistema di Kabat. Vedere Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)

Sono in uso diverse delimitazioni HVR, che rientrano nel presente documento. Le regioni determinanti la complementarità (CDR) di Kabat si basano sulla variabilità della sequenza e sono le più comunemente utilizzate (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Chothia si riferisce invece alla posizione dei loop strutturali (Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Le HVR AbM rappresentano un compromesso tra le HVR Kabat e i loop strutturali Chothia e sono utilizzati dal software di modellazione anticorpale AbM di Oxford Molecular. Le HVR "di contatto" si basano sull'analisi delle strutture cristalline complesse disponibili. I residui di ciascuno di queste HVR sono riportati nella Tabella 1.

Tabella 1. Delimitazioni HVR.

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

Le HVR possono comprendere "HVR estese" come segue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) e 89-97 o 89-96 (L3) nella V_L e 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) e 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) nella V_H . I residui del dominio variabile sono numerati secondo Kabat *et al.* per ciascuna di queste definizioni.

I residui amminoacidici di un anticorpo a dominio singolo (come il V_{HH}) sono numerati secondo la numerazione generale dei domini V_H fornita da Kabat *et al.* ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, Md., pubblicazione n. 91), come applicato ai domini V_{HH} dei camelidi nell'articolo di Riechmann e Muyldermans, *J. Immunol. Methods* 23 giugno 2000; 240 (1-2): 185-195. Secondo questa numerazione, FR1 di un V_{HH} comprende i residui amminoacidici nelle posizioni 1-30, CDR1 di un V_{HH} comprende i residui amminoacidici nelle posizioni 31-35, FR2 di un V_{HH} comprende gli amminoacidi nelle posizioni 36-49, CDR2 di un V_{HH} comprende i residui amminoacidici nelle posizioni 50-65, FR3 di un V_{HH} comprende i residui amminoacidici nelle posizioni 66-94, CDR3 di un V_{HH} comprende i residui amminoacidici nelle posizioni 95-102 e FR4 di un V_{HH} comprende i residui amminoacidici nelle posizioni 103-113. A questo proposito, va notato che, come è noto nella tecnica per i domini V_H e per i domini V_{HH} , il numero totale di residui amminoacidici in ciascuna CDR può variare e può non corrispondere al numero

totale di residui amminoacidici indicato dalla numerazione di Kabat (vale a dire che una o più posizioni secondo la numerazione di Kabat possono non essere occupate nella sequenza effettiva, o la sequenza effettiva può contenere un numero di residui amminoacidici superiore a quello consentito dalla numerazione di Kabat).

L'espressione "numerazione dei residui dei domini variabili come in Kabat" o "numerazione delle posizioni degli amminoacidi come in Kabat", e le relative variazioni, si riferisce al sistema di numerazione utilizzato per i domini variabili della catena pesante o della catena leggera della compilazione di anticorpi in Kabat *et al.* Utilizzando questo sistema di numerazione, l'effettiva sequenza lineare di amminoacidi può contenere un numero inferiore o aggiuntivo di amminoacidi corrispondenti all'accorciamento o all'inserimento in un FR o HVR del dominio variabile. Ad esempio, un dominio variabile a catena pesante può includere un singolo amminoacido inserito (residuo 52a secondo Kabat) dopo il residuo 52 di H2 e residui inseriti (*ad esempio* residui 82a, 82b e 82c, eccetera, secondo Kabat) dopo il residuo 82 di FR a catena pesante. La numerazione di Kabat dei residui può essere determinata per un determinato anticorpo mediante allineamento alle regioni di omologia della sequenza dell'anticorpo con una sequenza "standard" con numerazione di Kabat.

Se non diversamente indicato, la numerazione dei residui della catena pesante di un'immunoglobulina è quella dell'indice UE di Kabat *et al.* "L'indice EU come in Kabat" si riferisce alla numerazione dei residui dell'anticorpo umano IgG1 EU.

I residui "quadro" o "FR" sono quei residui del dominio variabile diversi dai residui HVR come qui definiti.

Un "quadro consensuale umano" o "quadro umano accettore" è un quadro che rappresenta i residui amminoacidici più comunemente presenti in una selezione di sequenze di immunoglobuline umane V_L o V_H . In genere, la selezione delle sequenze di immunoglobuline umane V_L o V_H avviene da un sottogruppo di sequenze a dominio variabile. In genere, il sottogruppo di sequenze è un sottogruppo come in Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Ad esempio, per la V_L , il sottogruppo può essere il sottogruppo kappa I, kappa II, kappa III o kappa IV, come indicato da Kabat *et al.* Inoltre, per la V_H , il sottogruppo può essere il sottogruppo I, il sottogruppo II o il sottogruppo III come in Kabat *et al.* In alternativa, un quadro di consenso umano può essere derivato da quanto sopra in cui particolari residui, ad esempio quando un residuo del quadro umano viene selezionato in base alla sua omologia con il quadro donatore allineando la sequenza del quadro donatore con una collezione di varie sequenze del quadro umano. Una struttura umana accettrice "derivata" da una struttura immunoglobulinica umana o da una struttura consensuale umana può comprendere la stessa sequenza amminoacidica, oppure può contenere modifiche alla sequenza amminoacidica preesistente. In alcune forme di realizzazione, il numero di modifiche di amminoacidi preesistenti è pari a 10 o meno, 9 o meno, 8 o meno, 7 o meno, 6 o meno, 5 o meno, 4 o meno, 3 o meno, o 2 o meno.

Una "modifica amminoacidica" in una posizione specifica, *ad esempio* della regione Fc, si riferisce alla sostituzione o alla delezione del residuo specificato o all'inserimento di almeno un residuo amminoacidico adiacente al residuo specificato. Per inserimento "adiacente" a un residuo specificato si intende l'inserimento entro uno o due residui dello stesso. L'inserimento può essere terminale N o terminale C del residuo specificato. La modifica amminoacidica preferita in questo caso è una sostituzione.

Un anticorpo "maturato per affinità" è un anticorpo che presenta una o più alterazioni in uno o più HVR che determinano un miglioramento dell'affinità dell'anticorpo per l'antigene, rispetto a un anticorpo genitore che non possiede tali alterazioni. In alcuni esempi, un anticorpo maturato per affinità ha affinità nanomolari o addirittura picomolari per l'antigene target. Gli anticorpi maturati per affinità sono prodotti con procedure note nella tecnica. Ad esempio, Marks *et al.*, *BioTechnology* 10:779-783 (1992) descrive la maturazione dell'affinità attraverso il rimescolamento dei domini V_H e V_L. La mutagenesi casuale dei residui HVR e/o della struttura è descritta, ad esempio, da: Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); e Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Secondo l'uso che ne viene fatto in questo documento, il termine "si lega specificamente", "riconosce specificamente" o è "specifico per" si riferisce a interazioni misurabili e riproducibili, come il legame tra un target e una proteina legante l'antigene (come un CAR o un sdAb), che è determinante per la presenza del target in presenza di una popolazione eterogenea di molecole, comprese le molecole biologiche. Ad esempio, una proteina legante l'antigene (come un CAR o un sdAb) che lega in modo specifico un target (che può essere un epitopo) è una proteina legante l'antigene (come un CAR o un sdAb) che lega questo target con maggiore affinità, avidità, più prontamente e/o con maggiore durata rispetto ad altri target. In alcune forme di realizzazione, l'entità del legame di una proteina legante l'antigene (come un CAR o un sdAb) con un target non correlato è inferiore a circa il 10% del legame della proteina legante l'antigene (come un CAR o un sdAb) con il target, misurato, *ad esempio*, mediante un saggio radioimmunologico (RIA). In alcune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene (come un CAR o un sdAb) che lega specificamente un target ha una costante di dissociazione (Kd) di $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, o $\leq 0,1 \text{ nM}$. In alcune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene (come un CAR o un sdAb) lega in modo specifico un epitopo su una proteina che è conservata tra le proteine di specie diverse. In alcune forme di realizzazione, il legame specifico può includere, ma non richiede, un legame esclusivo.

Il termine "specificità" si riferisce al riconoscimento selettivo di una proteina legante l'antigene (come un CAR o un sdAb) per un particolare epitopo di un antigene. Gli anticorpi naturali, ad esempio, sono monospecifici. Il termine "multispecifico" qui utilizzato indica che una proteina legante l'antigene (come un CAR o un sdAb) ha due o più siti di legame con l'antigene, di cui almeno due legano un antigene diverso o un epitopo diverso

dello stesso antigene. Il termine "bispecifico", come qui utilizzato, indica che una proteina legante l'antigene (come un CAR o un sdAb) ha due diverse specificità di legame con l'antigene. Il termine "CAR monospecifico" qui utilizzato indica una proteina legante l'antigene (come un CAR o un sdAb) che ha uno o più siti di legame, ciascuno dei quali lega lo stesso epitopo dello stesso antigene.

Il termine "valente", come qui utilizzato, indica la presenza di un numero specifico di siti di legame in una proteina legante l'antigene (come un CAR o un sdAb). Un anticorpo naturale, ad esempio, o un anticorpo completo, ha due siti di legame ed è bivalente. Pertanto, i termini "trivalente", "tetravalente", "pentavalente" ed "esavalente" indicano la presenza di due siti leganti, tre siti leganti, quattro siti leganti, cinque siti leganti e sei siti leganti, rispettivamente, in una proteina legante l'antigene (come un CAR o un sdAb).

Le "funzioni effettrici degli anticorpi" si riferiscono alle attività biologiche attribuibili alla regione Fc (una regione Fc di sequenza nativa o una regione Fc di sequenza amminoacidica) di un anticorpo e variano con l'isotipo dell'anticorpo. Esempi di funzioni effettrici degli anticorpi includono: Legame con C1q e citotossicità dipendente dal complemento; legame con il recettore Fc; citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC); fagocitosi; sottoregolazione dei recettori di superficie cellulare (*ad esempio*, recettori delle cellule B) e attivazione delle cellule B. Per funzione effettrice dell'anticorpo "ridotta o minimizzata" si intende quella ridotta di almeno il 50% (in alternativa il 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) rispetto all'anticorpo wild type o non modificato. La determinazione della funzione effettrice degli anticorpi è facilmente determinabile e misurabile da una persona di ordinaria competenza nella tecnica. In un esempio preferito, le funzioni effettrici degli anticorpi di legame con il complemento, citotossicità dipendente dal complemento e citotossicità dipendente dagli anticorpi sono influenzate. In alcuni esempi, la funzione di effettore viene eliminata attraverso una mutazione nella regione costante che elimina la glicosilazione, *ad esempio* una "mutazione senza effettore" In un aspetto, la mutazione senza effettori è una mutazione N297A o DANA (D265A+N297A) nella regione C_H2. Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276 (9): 6591-6604 (2001). In alternativa, ulteriori mutazioni che determinano una funzione effettrice ridotta o eliminata includono: K322A e L234A/L235A (LALA). In alternativa, la funzione effettrice può essere ridotta o eliminata attraverso tecniche di produzione, come l'espressione in cellule ospiti che non glicosilano (*ad esempio*, *E. coli*) o che risultano in un modello di glicosilazione alterato, inefficace o meno efficace nel promuovere la funzione effettrice (*ad esempio*, *E. coli*), Shinkawa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278(5): 3466-3473 (2003).

La "citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente" o ADCC si riferisce a una forma di citotossicità in cui le Ig secrete legate ai recettori Fc (FcR) presenti su alcune cellule citotossiche (*ad esempio*, cellule natural killer (NK), neutrofili e macrofagi) consentono a queste cellule effettrici citotossiche di legarsi specificamente a una cellula target portatrice di antigene e di uccidere successivamente la cellula target con citotossine. Gli anticorpi "armano" le cellule citotossiche e sono necessari per uccidere la cellula target con questo meccanismo. Le cellule primarie per la mediazione

dell'ADCC, le cellule NK, esprimono solo Fc γ RIII, mentre i monociti esprimono Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII. L'espressione di Fc sulle cellule ematopoietiche è riassunta nella Tabella 3 a pagina 464 di Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Per valutare l'attività ADCC di una molecola di interesse, un saggio ADCC *in vitro*, come quello descritto nel Brevetto U.S. n. 5,500,362 o 5,821,337 può essere eseguito. Le cellule effettrici utili per tali saggi includono le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) e le cellule natural killer (NK). In alternativa o in aggiunta, l'attività ADCC della molecola di interesse può essere valutata *in vivo*, ad esempio in un modello animale come quello illustrato in Clynes *et al.*, *PNAS USA* 95:652-656 (1998).

Il termine "regione Fc" viene qui utilizzato per definire una regione terminale C di una catena pesante di immunoglobuline, comprese le regioni Fc a sequenza nativa e le regioni Fc varianti. Sebbene i confini della regione Fc di una catena pesante di immunoglobuline possano variare, la regione Fc della catena pesante delle IgG umane è solitamente definita come un tratto che va da un residuo amminoacidico in posizione Cys226, o da Pro230, al suo carbossi-terminale. La lisina terminale C (residuo 447 secondo il sistema di numerazione dell'UE) della regione Fc può essere rimossa, ad esempio, durante la produzione o la purificazione dell'anticorpo, o mediante l'ingegnerizzazione ricombinante dell'acido nucleico che codifica una catena pesante dell'anticorpo. Di conseguenza, una composizione di anticorpi intatti può comprendere popolazioni di anticorpi con tutti i residui K447 rimossi, popolazioni di anticorpi senza residui K447 rimossi e popolazioni di anticorpi con una miscela di anticorpi con e senza il residuo K447. Le regioni Fc a sequenza nativa adatte all'uso negli anticorpi qui descritti includono le IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 e IgG4 umane.

Con "affinità di legame" si intende generalmente la forza della somma totale delle interazioni non covalenti tra un singolo sito di legame di una molecola (*ad esempio*, un anticorpo o un CAR) e il suo partner di legame (*ad esempio*, un antigene). Se non diversamente indicato, nel presente documento con "affinità di legame" si intende l'affinità di legame intrinseca che riflette un'interazione 1:1 tra i membri di una coppia di legami (*ad esempio*, anticorpo e antigene o CAR e antigene). L'affinità di una molecola X per il suo partner Y può essere generalmente rappresentata dalla costante di dissociazione (Kd). L'affinità può essere misurata con i comuni metodi noti nella tecnica, compresi quelli qui descritti. Gli anticorpi a bassa affinità generalmente legano l'antigene lentamente e tendono a dissociarsi prontamente, mentre gli anticorpi ad alta affinità generalmente legano l'antigene più velocemente e tendono a rimanere legati più a lungo. Nell'arte sono noti diversi metodi di misurazione dell'affinità di legame, ognuno dei quali può essere utilizzato. Esempi specifici illustrativi di misurazione dell'affinità di legame sono descritti di seguito.

Un anticorpo "bloccante" o "antagonista" è un anticorpo che inibisce o riduce l'attività biologica dell'antigene che lega. In alcuni esempi, gli anticorpi bloccanti o antagonisti inibiscono sostanzialmente o completamente l'attività biologica dell'antigene.

Un anticorpo "agonista" o attivante è un anticorpo che potenzia o avvia la segnalazione da parte dell'antigene a cui si lega. In alcune forme di

realizzazione, gli anticorpi agonisti provocano o attivano la segnalazione senza la presenza del ligando naturale.

"L'identità di sequenza amminoacidica in percentuale (%)" e "l'omologia" rispetto a una sequenza di peptidi, polipeptidi o anticorpi sono definite come la percentuale di residui amminoacidici in una sequenza candidata che sono identici ai residui amminoacidici nella sequenza specifica di peptidi o polipeptidi, dopo aver allineato le sequenze e introdotto lacune, se necessario, per ottenere la massima identità di sequenza in percentuale, e senza considerare eventuali sostituzioni conservative come parte dell'identità di sequenza. L'allineamento ai fini della determinazione dell'identità in percentuale delle sequenze amminoacidiche può essere ottenuto in vari modi che rientrano nell'abilità della tecnica, ad esempio utilizzando software informatici pubblicamente disponibili come BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Gli esperti del settore possono determinare i parametri appropriati per la misurazione dell'allineamento, compresi gli algoritmi necessari per ottenere il massimo allineamento sull'intera lunghezza delle sequenze da confrontare.

Il termine "recettore antigenico chimerico" o "CAR", come qui utilizzato, si riferisce a recettori geneticamente modificati, che possono essere utilizzati per innestare una o più specificità antigeniche su cellule effettrici immunitarie, come le cellule T. Alcuni CAR sono noti anche come "recettori artificiali delle cellule T", "recettori chimerici delle cellule T" o "recettori immunitari chimerici". Il CAR comprende un dominio extracellulare di legame con l'antigene specifico per uno o più antigeni (come gli antigeni tumorali), un dominio transmembrana e un dominio di segnalazione intracellulare di una cellula T e/o altri recettori. "CAR-T" si riferisce a una cellula T che esprime un CAR.

Una molecola di acido nucleico "isolata" che codifica un CAR o un sdAb qui descritto è una molecola di acido nucleico identificata e separata da almeno una molecola di acido nucleico contaminante con cui è normalmente associata nell'ambiente in cui è stata prodotta. Preferibilmente, l'acido nucleico isolato è privo di associazione con tutti i componenti associati all'ambiente di produzione. Le molecole di acido nucleico isolate che codificano i polipeptidi e gli anticorpi sono in una forma diversa da quella in cui si trovano in natura. Le molecole di acido nucleico isolate si distinguono quindi dall'acido nucleico che codifica i polipeptidi e gli anticorpi presenti nelle cellule.

Il termine "sequenze di controllo" si riferisce alle sequenze di DNA necessarie per l'espressione di una sequenza codificante operativamente collegata in un particolare organismo ospite. Le sequenze di controllo adatte ai procarioti, ad esempio, comprendono un promotore, eventualmente una sequenza operatore e un sito di legame per il ribosoma. È noto che le cellule eucariotiche utilizzano promotori, segnali di poliadenilazione ed esaltatori.

Un acido nucleico è "operativamente legato" quando è posto in relazione funzionale con un'altra sequenza di acido nucleico. Ad esempio, il DNA di una presequenza o di un leader secretorio è operativamente legato al DNA di un polipeptide se viene espresso come preproteina che partecipa alla secrezione del polipeptide; un promotore o un enhancer è operativamente legato a una sequenza codificante se influisce sulla trascrizione della

sequenza; oppure un sito di legame del ribosoma è operativamente legato a una sequenza codificante se è posizionato in modo da facilitare la traduzione. Generalmente, con "operativamente collegato" si intende che le sequenze di DNA che sono collegate sono contigue, e, nel caso di un leader secretorio, contigue e in fase di lettura. Tuttavia, i potenziatori non devono essere contigui. Il legame avviene mediante legatura in corrispondenza di opportuni siti di restrizione. Se tali siti non esistono, gli adattatori o linker oligonucleotidici sintetici vengono usati secondo la pratica convenzionale.

Il termine "vettore", come usato nel presente documento, si riferisce a una molecola di acido nucleico in grado di propagare un altro acido nucleico a cui è collegato. Il termine include il vettore come struttura di acido nucleico auto-replicante, nonché il vettore incorporato nel genoma di una cellula ospite in cui è stato introdotto. Alcuni vettori sono in grado di dirigere l'espressione degli acidi nucleici ai quali sono collegati operativamente. Tali vettori sono indicati nel presente documento come "vettori di espressione".

Come usato nel presente documento, il termine "autologo" si riferisce a qualsiasi materiale derivato dallo stesso individuo al quale deve essere successivamente re-introdotto.

Con "allogeneico" si intende un innesto derivato da un altro individuo della stessa specie.

Il termine "trasfettato" o "trasformato" o "trasdotto", come qui utilizzato, si riferisce a un processo mediante il quale l'acido nucleico esogeno viene trasferito o introdotto nella cellula ospite. Una cellula "trasfettata" o "trasformata" o "trasdotta" è una cellula che è stata trasfettata, trasformata o trasdotta con acido nucleico esogeno. La cellula comprende la cellula primaria del soggetto e la sua progenie.

Nel presente documento, le espressioni "cellula", "linea cellulare" e "coltura cellulare" sono usate in modo intercambiabile e tutte queste denominazioni includono la progenie. Pertanto, i termini "trasfettanti" e "cellule trasfettate" includono la cellula primaria soggetta e le colture da essa derivate senza tener conto del numero di trasferimenti. È inoltre inteso che tutte le progenie possono non essere esattamente identiche nel contenuto di DNA, a causa di mutazioni intenzionali o involontarie. Sono incluse le progenie di varianti che hanno la stessa funzione o attività biologica della cellula originariamente trasformata.

I termini "cellula ospite", "linea cellulare ospite" e "coltura cellulare ospite" sono usati in modo intercambiabile e si riferiscono alle cellule in cui è stato introdotto acido nucleico esogeno, compresa la progenie di tali cellule. Le cellule ospiti comprendono i "trasformanti" e le "cellule trasformate", che includono la cellula trasformata primaria e la progenie da essa derivata, senza tener conto del numero di passaggi. La progenie può non essere completamente identica nel contenuto di acidi nucleici alla cellula madre, ma può contenere mutazioni. Sono incluse le progenie mutanti che hanno la stessa funzione o attività biologica della cellula originariamente trasformata.

Come usato qui, "trattamento" o "trattare" è un approccio per ottenere risultati benefici o desiderati, compresi i risultati clinici. Ai fini della presente invenzione, i risultati clinici benefici o desiderati includono, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, uno o più dei seguenti: alleviare uno o più sintomi derivanti dalla malattia, ridurre l'estensione della malattia, stabilizzare la malattia (*ad esempio*, prevenire o ritardare il peggioramento della malattia), prevenire o ritardare la diffusione (*ad esempio*, metastasi) della malattia, prevenire o ritardare la recidiva della malattia, ritardare o rallentare la progressione della malattia, migliorare lo stato di malattia, fornire una remissione (parziale o totale) della malattia, diminuire la dose di uno o più altri farmaci necessari per trattare la malattia, ritardare la progressione della malattia, aumentare la qualità della vita e/o prolungare la sopravvivenza. Il termine "trattamento" comprende anche la riduzione delle conseguenze patologiche del cancro. Gli usi della presente invenzione contemplano uno o più di questi aspetti del trattamento.

Come usato nel presente documento, un "individuo" o un "soggetto" si riferisce a un mammifero, inclusi, ma non solo, esseri umani, bovini, cavalli, felini, canini, roditori o primati. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è un essere umano.

Il termine "quantità efficace" qui utilizzato si riferisce a una quantità di un agente, come un anticorpo a dominio singolo, una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata o una sua composizione farmaceutica, sufficiente a trattare un disturbo, una condizione o una malattia specifica, come migliorare, palliare, attenuare e/o ritardare uno o più dei suoi sintomi. In riferimento al cancro, una quantità efficace comprende una quantità sufficiente a provocare la riduzione del tumore e/o a diminuirne il tasso di crescita (ad esempio, a sopprimere la crescita del tumore) o a prevenire o ritardare altre proliferazioni cellulari indesiderate. In alcune forme di realizzazione, una quantità efficace è una quantità sufficiente a ritardare lo sviluppo. In alcune forme di realizzazione, una quantità efficace è una quantità sufficiente a prevenire o ritardare le recidive. Una quantità efficace può essere somministrata in una o più somministrazioni. La quantità efficace del farmaco o della composizione può: (i) ridurre il numero di cellule tumorali; (ii) ridurre le dimensioni del tumore; (iii) inibire, ritardare, rallentare in qualche misura e preferibilmente arrestare l'infiltrazione delle cellule tumorali negli organi periferici; (iv) inibire (*vale a dire* rallentare in qualche misura e preferibilmente arrestare) le metastasi tumorali; (v) inibire la crescita del tumore; (vi) prevenire o ritardare l'insorgenza e/o la recidiva del tumore; e/o (vii) alleviare in qualche misura uno o più sintomi associati al cancro.

Con "contesto adiuvante" si intende un contesto clinico in cui un individuo ha avuto una storia di cancro e generalmente (ma non necessariamente) è stato responsivo alla terapia, che include, ma non è limitata a, chirurgia (*ad esempio*, resezione chirurgica), radioterapia e chemioterapia. Tuttavia, a causa della loro storia di cancro, questi individui sono considerati a rischio di sviluppare la malattia. Il trattamento o la somministrazione nel "contesto adiuvante" si riferisce a una modalità di trattamento successiva. Il grado di rischio (*ad esempio*, quando un individuo in fase adiuvante è considerato "ad alto rischio" o "a basso rischio") dipende da diversi fattori, in genere dall'estensione della malattia al momento del primo trattamento.

Con "contesto neoadiuvante" si intende un contesto clinico in cui il metodo viene eseguito prima della terapia primaria/definitiva.

Come usato qui, "ritardare" lo sviluppo del cancro significa differire, ostacolare, rallentare, ritardare, stabilizzare e/o posticipare lo sviluppo della malattia. Questo ritardo può essere di durata variabile, a seconda della storia della malattia e/o dell'individuo da trattare. Come è evidente a un esperto della tecnica, un ritardo sufficiente o significativo può, in effetti, comprendere la prevenzione, nel senso che l'individuo non sviluppa la malattia. Un metodo che "ritarda" lo sviluppo del cancro è un metodo che riduce la probabilità di sviluppo della malattia in un determinato periodo di tempo e/o riduce l'estensione della malattia in un determinato periodo di tempo, rispetto al mancato utilizzo del metodo. Tali confronti si basano in genere su studi clinici, utilizzando un numero statisticamente significativo di individui. Lo sviluppo del cancro può essere rilevato con metodi standard, tra cui, ma non solo, la tomografia assiale computerizzata (CAT Scan), la risonanza magnetica (MRI), l'ecografia addominale, i test di coagulazione, l'arteriografia o la biopsia. Lo sviluppo può anche riferirsi alla progressione del cancro che può essere inizialmente non rilevabile e comprende la comparsa, la recidiva e l'insorgenza.

Il termine "formulazione farmaceutica" si riferisce a una preparazione che si presenta in forma tale da consentire l'efficacia dell'attività biologica del principio attivo e che non contiene componenti aggiuntivi che siano inaccettabilmente tossici per un soggetto a cui la formulazione verrebbe somministrata. Tali formulazioni sono sterili. Una formulazione "sterile" è asettica o priva di microrganismi viventi e delle loro spore.

I "carrier" qui utilizzati includono carrier, eccipienti o stabilizzatori farmaceuticamente accettabili che non sono tossici per la cellula o il mammifero che vi è esposto ai dosaggi e alle concentrazioni impiegati. Spesso il carrier fisiologicamente accettabile è una soluzione acquosa a pH tamponato. Esempi di carrier fisiologicamente accettabili sono i tamponi come il fosfato, il citrato e altri acidi organici; gli antiossidanti, tra cui l'acido ascorbico e la metionina; i conservanti (come cloruro di ottadecildimetilbenzilammonio; cloruro di esametonio; cloruro di benzalconio, cloruro di benzetonio; alcool fenolico, butilico o benzilico; parabeni alchilici come il parabene metilico o propilico; catecolo; resorcinolo; cicloesano; 3-pentano e m-cresolo); polipeptidi a basso peso molecolare (meno di 10 residui circa); proteine, come la sieralbumina, la gelatina o le immunoglobuline; polimeri idrofili come il polivinilpirrolidone; amminoacidi come glicina, glutammina, asparagina, arginina o lisina; monosaccaridi, disaccaridi e altri carboidrati, tra cui glucosio, mannosio o destrine; agenti chelanti come l'EDTA; zuccheri come saccarosio, mannitolo, trealosio o sorbitolo; controioni che formano sali come il sodio; complessi metallici (*ad esempio*. complessi Zn-proteine); e/o tensioattivi non ionici come TWEEN™, polietilenglicole (PEG) e PLURONICS™ o polietilenglicole (PEG).

Il "diluente" di interesse è quello farmaceuticamente accettabile (sicuro e non tossico per la somministrazione agli esseri umani) e utile per la preparazione di una formulazione liquida, come una formulazione ricostituita dopo la liofilizzazione. Esempi di diluenti sono l'acqua sterile, l'acqua

batteriostatica per uso iniettabile (BWF), una soluzione tamponata a pH (*ad esempio* soluzione fisiologica tamponata con fosfati), una soluzione salina sterile, la soluzione di Ringer o una soluzione di destrosio. In una forma di realizzazione alternativa, i diluenti possono includere soluzioni acquose di sali e/o tamponi.

Un "conservante" è un composto che può essere aggiunto alle formulazioni qui descritte per ridurre l'attività batterica. L'aggiunta di un conservante può, ad esempio, facilitare la produzione di una formulazione multiuso (a più dosi). Esempi di potenziali conservanti sono il cloruro di ottadecildimetilbenzilammonio, il cloruro di esametonio, il cloruro di benzalconio (una miscela di cloruri di alchilbenzildimetilammonio in cui i gruppi alchilici sono composti a catena lunga) e il cloruro di benzetonio. Altri tipi di conservanti sono gli alcoli aromatici come il fenolo, l'alcol butilico e benzilico, i parabeni alchilici come il parabene metilico o propilico, il catecolo, il resorcinolo, il cicloesanololo, il 3-pentanololo e l'm-cresolo. Il conservante preferito è l'alcol benzilico.

Una formulazione "stabile" è quella in cui la proteina contenuta conserva essenzialmente la sua stabilità e integrità fisica e chimica durante la conservazione. Nell'arte sono disponibili diverse tecniche analitiche per la misurazione della stabilità delle proteine, esaminate in *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) e Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993).

La stabilità può essere misurata a una temperatura selezionata per un periodo di tempo selezionato. Per uno screening rapido, la formulazione può essere conservata a 40°C. per un periodo compreso tra 2 settimane e 1 mese, dopodiché si misura la stabilità. Se la formulazione deve essere conservata a 2-8°C, in genere la formulazione deve essere stabile a 30° C o 40°C per almeno 1 mese e/o stabile a 2-8° C per almeno 2 anni. Se la formulazione deve essere conservata a 30° C, in genere la formulazione deve essere stabile per almeno 2 anni a 30° C. e/o stabile a 40° C. per almeno 6 mesi. Ad esempio, il grado di aggregazione durante la conservazione può essere utilizzato come indicatore della stabilità delle proteine. Pertanto, una formulazione "stabile" può essere quella in cui meno del 10% circa e preferibilmente meno del 5% circa delle proteine sono presenti come aggregati nella formulazione. In altri casi, è possibile determinare l'eventuale aumento della formazione di aggregati durante la conservazione della formulazione.

Una formulazione "ricostituita" è una formulazione preparata sciogliendo una proteina liofilizzata o una formulazione di anticorpi in un diluente in modo che la proteina sia dispersa. La formulazione ricostituita è adatta per la somministrazione (*ad esempio* per via sottocutanea) a un paziente da trattare con la proteina di interesse e, in alcuni casi della presente invenzione, può essere adatta per la somministrazione parenterale o endovenosa.

Una formulazione "isotonica" è quella che ha essenzialmente la stessa pressione osmotica del sangue umano. Le formulazioni isotoniche hanno generalmente una pressione osmotica compresa tra circa 250 e 350 mOsm. Il termine "ipotonico" descrive una formulazione con una pressione

osmotica inferiore a quella del sangue umano. Analogamente, il termine "ipertonico" è usato per descrivere una formulazione con una pressione osmotica superiore a quella del sangue umano. L'isotonicità può essere misurata, ad esempio, con un osmometro a pressione di vapore o a congelamento. Le formulazioni della presente invenzione sono ipertoniche grazie all'aggiunta di sali e/o tamponi.

Resta inteso che le forme di realizzazione della presente invenzione qui fornite includono forme di realizzazione "costituite" e/o "costituite essenzialmente da".

Il riferimento a "circa" un valore o un parametro qui include (e descrive) variazioni che sono dirette a quel valore o parametro *di per sé*. Ad esempio, la descrizione che si riferisce a "circa X" include la descrizione di "X".

Come usato nel presente documento, il riferimento a "non" un valore o parametro significa e descrive generalmente "diverso da" un valore o parametro.

Ad esempio, il metodo non è utilizzato per trattare il cancro di tipo X significa che il metodo è utilizzato per trattare il cancro di tipi diversi da X.

Il termine "circa X-Y" qui utilizzato ha lo stesso significato di "circa X a circa Y".

Come usato in questa sede e nelle rivendicazioni allegate, le forme singolari "un/uno/una", "o" e "il/lo/la" comprendono riferimenti plurali a meno che il contesto non richieda chiaramente il contrario.

II. Anticorpi a Dominio Singolo

Sono qui presentati come riferimento gli anticorpi a dominio singolo, i loro frammenti leganti l'antigene e le proteine leganti l'antigene che comprendono uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo. Esempi di anticorpi a dominio singolo, che possono essere compresi nel CAR dell'invenzione, sono elencati nella Tabella 2.

Tabella 2. Esempi di anticorpi a dominio singolo.

Ab	Es. AA SEQ ID	Es. NA SEQ ID	CDR1	CDR2	CDR3
Esempi di anticorpi anti-CD19 a dominio singolo					
CD19 V _H H	76	101	INRMG (SEQ ID NO: 1)	SITVRGITNYADSVKG (SEQ ID NO:2)	VSSNRDPDY (SEQ ID NO: 3)
Esempi di anticorpi anti-CD20 a dominio singolo					
CD20 V _H H	77	102	IGTMG (SEQ ID NO: 4)	AIRWSTGGTRYADSVKG (SEQ ID NO: 5)	DRLSLDLSGRYHYNPAVYDY (SEQ ID NO: 6)
Esempi di anticorpi anti-BCMA a dominio singolo					
269A3 7346	78	103	SGFTLDYYAIG (SEQ ID NO: 7)	CISRSDBGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 18)	AGADCSGYLRDYEF (SEQ ID NO: 29)
269A3 7348	79	104	SGRTFSTYGM A (SEQ ID NO: 8)	SKASMNYSGRYYADSVKG (SEQ ID NO: 19)	AGTGCSTYGCFDAQIIDY (SEQ ID NO: 30)
269A3 7917	80	105	SGRTFTMG (SEQ ID NO: 9)	AISLPTLAYYAESVKG (SEQ ID NO: 20)	ADRKSVMsIRPDY (SEQ ID NO: 31)
269A3 7355	81	106	SGGIFVINAMG (SEQ ID NO: 10)	SIRGLGRNTYDDSVKG (SEQ ID NO: 21)	VYVTLGGVNRDY (SEQ ID NO: 32)
269A3 7915	82	107	SGRTFSSIVMG (SEQ ID NO: 11)	AIMWNDGITYLQDSVKG (SEQ ID NO: 22)	ASKGRYSEYDY (SEQ ID NO: 33)

269A3 7936	83	108	SGFTFDRAVIV (SEQ ID NO: 12)	FIKPSDGTIYYIDSLKG (SEQ ID NO: 23)	ASPEDWYTDWIDWSIYR (SEQ ID NO: 34)
269A3 7953	84	109	STYTVNSDVM G (SEQ ID NO: 13)	AIMWNDGITYLQDSVKG (SEQ ID NO: 24)	ASKGRYSEYEY (SEQ ID NO: 35)
269A3 7965	85	110	SGATLTNDHM A (SEQ ID NO: 14)	AIDWSGRRTNYADPVEG (SEQ ID NO: 25)	VLRAWISYDNDY (SEQ ID NO: 36)
269A3 7972	86	111	SGGTLKNTVA (SEQ ID NO: 15)	SITWDGTTYADSVKG (SEQ ID NO: 26)	DLGKWPAGPADY (SEQ ID NO: 37)
269A3 7353	87	112	SEHTFSSHVM G (SEQ ID NO: 16)	VIGWRDISTSYADSVKG (SEQ ID NO: 27)	ARRIDAADFDS (SEQ ID NO: 38)
269A3 7948	88	113	SGRAFSTYFM A (SEQ ID NO: 17)	GIAWSSGTAYADSVKG (SEQ ID NO: 28)	SRGIEVEEFGA (SEQ ID NO: 39)
Esempi di anticorpi anti-CD38 a dominio singolo					
38A37 333	89	114	SGLTFSSYPM M (SEQ ID NO: 40)	RISDSGGYTNYDDSVKG (SEQ ID NO: 52)	ILGLPT (SEQ ID NO: 64)
38A37 336	90	115	SGFTFSSNWM Y (SEQ ID NO: 41)	TISTDGRGTYKDSVKG (SEQ ID NO: 53)	KEPRVLMAYLRNLGDFGS (SEQ ID NO: 65)
38A37 699	91	116	SGRIFSNAMG (SEQ ID NO: 42)	AISTAGSTNYGDSVKG (SEQ ID NO: 54)	LNFPYVY (SEQ ID NO: 66)
38A37 331	92	117	SGSIFKVFRVF AMS (SEQ ID NO: 43)	SISSGETTYADSVKG (SEQ ID NO: 55)	ADHTFTGDF (SEQ ID NO: 67)
38A37 717	93	118	TGKVFSIYDM G (SEQ ID NO: 44)	EITSSGTTHYDDFVSG (SEQ ID NO: 56)	NHVFGGSY (SEQ ID NO: 68)
38A37 719	94	119	SASIFTRLPMG (SEQ ID NO: 45)	GIVPSGRINYADSVKG (SEQ ID NO: 57)	ADTFPLPT (SEQ ID NO: 69)
38A37 330	95	120	SGRAYATMA (SEQ ID NO: 46)	HLRVSGDTTYTDSVKG (SEQ ID NO: 58)	GPYGILAAARVSNPGNYDY (SEQ ID NO: 70)
38A37 334	96	121	SGLTFSSYIMG (SEQ ID NO: 47)	EISSGGMTSYADSVKG (SEQ ID NO: 59)	APERGSIWYSRYEYKY (SEQ ID NO: 71)
38A37 730	97	122	SQGIFTINAMG (SEQ ID NO: 48)	EVSSGRDYADSVKG (SEQ ID NO: 60)	VSGWHVFGDRIV (SEQ ID NO: 72)
38A37 340	98	123	SGRTFSSYAMA (SEQ ID NO: 49)	SISTSGGITDYADSVKG (SEQ ID NO: 61)	ARTWYLRTSLQYDY (SEQ ID NO: 73)
38A37 731	99	124	SGTIVSISTMG (SEQ ID NO: 50)	TITRRGRNTYTDSVKG (SEQ ID NO: 62)	AEVQLDIWASAYDY (SEQ ID NO: 74)
38A37 326	100	125	SGRTYAMG (SEQ ID NO: 51)	TISGAGNTKYADSVKG (SEQ ID NO: 63)	AGKWFPAAANEY (SEQ ID NO: 75)

Anticorpi a dominio singolo anti-CD19

Vengono presentati come riferimento anticorpi a dominio singolo isolati che si legano specificamente a CD19, come CD19 umano. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 modula l'attività di CD19. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 è un anticorpo antagonista.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprendente almeno una, almeno due o tutte e tre le CDR selezionate tra (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 2; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 3. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:1; (b) una CDR2 avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2; e (c) una CDR3 avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-CD19 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, una CDR avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% di identità contiene sostituzioni (per esempio sostituzioni conservative), inserzioni o delezioni rispetto alla sequenza di riferimento, ma l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprendente tale sequenza conserva la capacità di legarsi a CD19. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-CD19 è maturato per affinità. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:

2; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 3. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-CD19 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprendente un dominio V_HH avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76. In alcune forme di realizzazione, una sequenza V_HH avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% di identità contiene sostituzioni (per esempio sostituzioni conservative), inserzioni o delezioni rispetto alla sequenza di riferimento, ma l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprendente tale sequenza conserva la capacità di legarsi a CD19. In alcune forme di realizzazione, da 1 a 10 amminoacidi in totale sono stati sostituiti, inseriti e/o eliminati nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76. In alcune forme di realizzazione, le sostituzioni, le inserzioni o le delezioni si verificano in regioni esterne alle CDR (vale a dire nelle FR).

Facoltativamente, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76, incluse le modifiche post-traduzionali di tale sequenza. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-CD19 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76.

In alcuni esempi, gli epitopi funzionali possono essere mappati mediante scansione di alanina combinatoriale. In questo processo, una strategia di scansione di alanina combinatoriale può essere utilizzata per identificare gli amminoacidi nella proteina CD19 che sono necessari per l'interazione con gli anticorpi a dominio singolo anti-CD19. In alcuni esempi, l'epitopo è conformazionale e può essere impiegata la struttura cristallina dell'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 legato a CD19 per identificare gli epitopi. Viene presentato come riferimento un anticorpo che si lega specificamente allo stesso epitopo di uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo anti-CD19 qui forniti. Ad esempio, vi è un anticorpo che si lega allo stesso epitopo di un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76.

Viene presentato come riferimento un anticorpo anti-CD19, o un suo frammento legante l'antigene, che si lega specificamente a CD19 in modo competitivo con uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo anti-CD19 qui descritti. In alcuni esempi, il legame competitivo può essere determinato utilizzando un saggio ELISA. Ad esempio, vi è un anticorpo che si lega specificamente a CD19 in modo competitivo con un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:76.

Viene presentato come riferimento un anticorpo anti-CD19 o una proteina legante l'antigene comprendente uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo anti-CD19 descritti sopra. In alcuni esempi, l'anticorpo anti-CD19 è un anticorpo monoclonale, incluso un anticorpo camelide, chimerico, umanizzato o umano. In alcuni esempi, l'anticorpo anti-CD19 è un frammento di anticorpo, per esempio un frammento V_HH. In alcuni esempi, l'anticorpo anti-CD19 è un anticorpo a sola catena pesante a lunghezza intera comprendente una regione Fc di qualsiasi classe o isotipo anticorpale, come IgG1 o IgG4. In alcuni esempi, la regione Fc ha una funzione effettrice ridotta o minimizzata.

Un anticorpo anti-CD19 (come un anticorpo a dominio singolo anti-CD19) o una proteina legante l'antigene può incorporare una qualsiasi delle caratteristiche, singolarmente o in combinazione, descritte nelle Sezioni 1-7 di "Caratteristiche degli anticorpi" di seguito.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante gli anticorpi a dominio singolo anti-CD19 compresi nel CAR dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante un anticorpo a dominio singolo anti-CD19, in cui l'acido nucleico comprende una sequenza avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO:101. In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato comprendente la sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 101. In alcune forme di realizzazione, è fornito un vettore (per esempio un vettore di espressione) comprendente tale acido nucleico. In alcune forme di realizzazione, è fornita una cellula ospite comprendente tale acido nucleico. Viene divulgato un metodo di produzione di un anticorpo anti-CD19, in cui il metodo comprende la coltura di una cellula ospite comprendente un acido nucleico codificante l'anticorpo anti-CD19, in condizioni adatte all'espressione dell'anticorpo anti-CD19, e facoltativamente il recupero dell'anticorpo anti-CD19 dalla cellula ospite (o dal terreno di coltura della cellula ospite).

Anticorpi a dominio singolo anti-CD20

Vengono qui presentati come riferimento anticorpi a dominio singolo isolati che si legano specificamente a CD20, come CD20 umano. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 modula l'attività di CD20. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 è un anticorpo antagonista.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprendente almeno una, almeno due o tutte e tre le CDR selezionate tra (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 4; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 5; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 6. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:4; (b) una CDR2 avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:5; e (c) una CDR3 avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:6. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-CD20 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, una CDR avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% di identità contiene sostituzioni (per esempio sostituzioni conservative), inserzioni o delezioni rispetto alla sequenza di riferimento, ma l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprendente tale sequenza conserva la capacità di legarsi a CD20. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 è maturato per affinità. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 4; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:

5; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 6. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprendente un dominio V_HH avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77. In alcune forme di realizzazione, una sequenza V_HH avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% di identità contiene sostituzioni (per esempio sostituzioni conservative), inserzioni o delezioni rispetto alla sequenza di riferimento, ma l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprendente tale sequenza conserva la capacità di legarsi a CD20. In alcune forme di realizzazione, da 1 a 10 amminoacidi in totale sono stati sostituiti, inseriti e/o eliminati nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77. In alcune forme di realizzazione, le sostituzioni, le inserzioni o le delezioni si verificano in regioni esterne alle CDR (vale a dire nelle FR). Facoltativamente, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77, incluse le modifiche post-traduzionali di tale sequenza.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77. In alcune forme di realizzazione, è fornito un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77.

In alcuni esempi, gli epitopi funzionali possono essere mappati mediante scansione di alanina combinatoriale. In questo processo, una strategia di scansione di alanina combinatoriale può essere utilizzata per identificare gli amminoacidi nella proteina CD20 che sono necessari per l'interazione con gli anticorpi a dominio singolo anti-CD20. In alcuni esempi, l'epitopo è conformazionale e può essere impiegata la struttura cristallina dell'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 legato a CD20 per identificare gli epitopi. In alcuni esempi, vi è un anticorpo che si lega specificamente allo stesso epitopo di uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo anti-CD20 qui forniti. Ad esempio, in alcuni esempi, vi è un anticorpo che si lega allo stesso epitopo di un anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77.

Viene presentato come riferimento un anticorpo anti-CD20, o un suo frammento legante l'antigene, che si lega specificamente a CD20 in modo competitivo con uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo anti-CD20 qui descritti. In alcuni esempi, il legame competitivo può essere

determinato utilizzando un saggio ELISA. Ad esempio, in alcuni esempi, vi è un anticorpo che si lega specificamente a CD20 in modo competitivo con un anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:77.

Viene presentato come riferimento un anticorpo anti-CD20 o una proteina legante l'antigene comprendente uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo anti-CD20 descritti sopra. In alcuni esempi, l'anticorpo anti-CD20 è un anticorpo monoclonale, incluso un anticorpo camelide, chimerico, umanizzato o umano. In alcuni esempi, l'anticorpo anti-CD20 è un frammento di anticorpo, per esempio un frammento V_HH. In alcuni esempi, l'anticorpo anti-CD20 è un anticorpo a sola catena pesante a lunghezza intera comprendente una regione Fc di qualsiasi classe o isotipo anticorpale, come IgG1 o IgG4. In alcuni esempi, la regione Fc ha una funzione effettrice ridotta o minimizzata.

Un anticorpo anti-CD20 (come un anticorpo a dominio singolo anti-CD20) o una proteina legante l'antigene può incorporare una qualsiasi delle caratteristiche, singolarmente o in combinazione, descritte nelle Sezioni 1-7 di "Caratteristiche degli anticorpi" di seguito.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo anti-CD20 dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante un anticorpo a dominio singolo anti-CD20, in cui l'acido nucleico comprende una sequenza avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO:102. In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato comprendente la sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 102. In alcune forme di realizzazione, è fornito un vettore (per esempio un vettore di espressione) comprendente tale acido nucleico. In alcune forme di realizzazione, è fornita una cellula ospite comprendente tale acido nucleico. Viene divulgato un metodo di produzione di un anticorpo anti-CD20, in cui il metodo comprende la coltura di una cellula ospite comprendente un acido nucleico codificante l'anticorpo anti-CD20, in condizioni adatte all'espressione dell'anticorpo anti-CD20, e facoltativamente il recupero dell'anticorpo anti-CD20 dalla cellula ospite (o dal terreno di coltura della cellula ospite).

Anticorpi anti-BCMA a dominio singolo

Sono qui presentati come riferimento anticorpi isolati a dominio singolo che si legano specificamente a BCMA, come BCMA umano. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo modula l'attività di BCMA. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo è un anticorpo antagonista.

L'antigene maturo delle cellule B (BCMA), noto anche come CD269, è un membro della superfamiglia dei recettori del fattore di necrosi tumorale, in particolare del TNFRSF17 (Thompson et al., J. Exp. Medicine, 192 (1):129-135, 2000). Il BCMA umano è espresso quasi esclusivamente nelle plasmacellule e nelle cellule di mieloma multiplo (vedere *ad esempio*, Novak et al., Blood, 103(2): 689-694, 2004; Neri et al., Clinical Cancer

Research, 73(19):5903-5909; Felix et al., Mol. Oncology, 9(7): 1348-58, 2015). Il BCMA può legare il fattore di attivazione delle cellule B (BAFF) e un ligando di proliferazione incluso (APRIL) (*ad esempio*, Mackay et al., 2003 e Kalled et al., Immunological Review, 204: 43-54, 2005). Il BCMA può essere un target antigenico tumorale adatto per gli agenti immunoterapeutici contro il mieloma multiplo. Gli anticorpi ad alta affinità possono bloccare il legame tra BCMA e i suoi ligandi nativi BAFF e APRIL. Gli anticorpi anti-BCMA a dominio singolo possono essere utilizzati in combinazione con l'immunoterapia cellulare con cellule CAR-T, ad esempio, per potenziare gli effetti citotossici contro le cellule tumorali.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 78. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 79. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 80. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 81. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 82. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 83. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 84. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 85. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 86. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 87. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 88. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo comprende un quadro umano accettore, *ad esempio* un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo anti-BCMA a dominio singolo che comprende almeno una, almeno

due o tutte e tre le CDR selezionate tra (a) una CDR1 che comprende una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO:7-17; (b) una CDR2 che comprende una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO:18-28; e (c) una CDR3 che comprende una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO:29-39. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo comprende un quadro umano accettore, *ad esempio* un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo anti-BCMA a dominio singolo che comprende tre CDR: (a) una CDR1 avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO:7-17; (b) una CDR2 avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con una sequenza di amminoacidi selezionata da SEQ ID NO:18-28; e (c) una CDR3 avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO:29-39. In alcune forme di realizzazione, una CDR che presenta almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% di identità contiene sostituzioni (*ad esempio*, sostituzioni conservative), inserzioni o delezioni rispetto alla sequenza di riferimento, ma l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA che comprende tale sequenza mantiene la capacità di legarsi al BCMA. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo è maturato per affinità. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo comprende un quadro umano accettore, *ad esempio* un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 7; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 18; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 29. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 8; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica

di SEQ ID NO: 19; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 30. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un secondo anticorpo anti-BCMA a dominio singolo con tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 9; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 20; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 31. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo comprende un quadro umano accettore, *ad esempio* un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo anti-BCMA a dominio singolo con tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 10; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 21; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 32. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo comprende un quadro umano accettore, *ad esempio* un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 11; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 22; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 33. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 12; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 23; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 34. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a

dominio singolo anti-BCMA è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 13; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 35. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 14; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 25; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 36. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 15; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 26; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 37. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 16; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 27; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 38. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è umanizzato. In alcune forme

di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 17; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 28; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 39. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente un dominio V_HH avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto a una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO: 78-88. In alcune forme di realizzazione, una sequenza V_HH avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% di identità contiene sostituzioni (per esempio sostituzioni conservative), inserzioni o delezioni rispetto alla sequenza di riferimento, ma l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente tale sequenza conserva la capacità di legarsi a BCMA. In alcune forme di realizzazione, da 1 a 10 amminoacidi in totale sono stati sostituiti, inseriti e/o eliminati in una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO: 78-88. In alcune forme di realizzazione, le sostituzioni, le inserzioni o le delezioni si verificano in regioni esterne alle CDR (vale a dire nelle FR). Facoltativamente, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprende una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO: 78-88, incluse le modifiche post-traduzionali di tale sequenza.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 78. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 78. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 79. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 79. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 80. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 80. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente un

dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 81. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 81. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 82. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 82. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 83. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 83. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 84. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 84. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 85. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 85. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 86. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 86. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 87. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 87. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 88. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 88.

In alcuni esempi, gli epitopi funzionali possono essere mappati mediante scansione combinatoria delle alanine. In questo processo, una strategia combinatoria di scansione delle alanine può essere utilizzata per identificare gli amminoacidi della proteina BCMA necessari per l'interazione con gli anticorpi anti-BCMA a dominio singolo. In alcuni esempi, l'epitopo è conformazionale e la struttura cristallina dell'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA legato a BCMA può essere utilizzata per identificare gli epitopi. In alcuni esempi, esiste un anticorpo che si lega specificamente allo stesso epitopo di uno qualsiasi degli anticorpi anti-BCMA a dominio singolo qui forniti. Ad esempio, in alcuni esempi, esiste un anticorpo che si lega allo stesso epitopo di un anticorpo anti-BCMA a dominio singolo comprendente una qualsiasi delle sequenze amminoacidiche di SEQ ID NO:78-88.

Viene presentato come riferimento un anticorpo anti-BCMA, o un suo frammento legante l'antigene, che si lega specificamente a BCMA in modo competitivo con uno qualsiasi degli anticorpi anti-BCMA a dominio singolo qui descritti. In alcuni esempi il legame competitivo può essere determinato con un saggio ELISA. Ad esempio, in alcuni esempi esiste un anticorpo che si lega specificamente a BCMA in modo competitivo con un anticorpo anti-BCMA a dominio singolo comprendente una qualsiasi delle sequenze amminoacidiche di SEQ ID NO:78-88.

È stato presentato come riferimento un anticorpo anti-BCMA o una proteina legante l'antigene che comprende uno qualsiasi degli anticorpi anti-BCMA a dominio singolo sopra descritti. In alcuni esempi l'anticorpo anti-BCMA è un anticorpo monoclonale, compreso un anticorpo camelide, chimerico, umanizzato o umano. In alcuni esempi, l'anticorpo anti-BCMA è un frammento di anticorpo, *ad esempio* un frammento V_HH. In alcuni esempi, l'anticorpo anti-BCMA è un anticorpo di sola catena pesante a lunghezza intera che comprende una regione Fc di qualsiasi classe o isotipo di anticorpo, come IgG1 o IgG4. In alcuni esempi la regione Fc ha una funzione effettrice ridotta o minimizzata.

Un anticorpo anti-BCMA (come l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo) o una proteina legante l'antigene può incorporare una qualsiasi delle caratteristiche, singolarmente o in combinazione, descritte nelle Sezioni 1-7 di "Caratteristiche degli anticorpi".

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un acido nucleico isolato che codifica gli anticorpi anti-BCMA a dominio singolo compresi nel CAR dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, viene fornito un acido nucleico isolato che codifica un anticorpo anti-BCMA a dominio singolo, in cui l'acido nucleico comprende una sequenza che ha almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con una sequenza di acido nucleico selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 103-113.

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un acido nucleico isolato che comprende una sequenza di acido nucleico selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO:103-113. In alcune forme di realizzazione, viene fornito un vettore (*ad esempio*, un vettore di espressione) che comprende tale acido nucleico. In alcune forme di realizzazione, viene fornita una cellula ospite che comprende tale acido nucleico. È stato presentato un metodo per la produzione di un anticorpo anti-BCMA che comprende la messa in coltura di una cellula ospite comprendente un acido nucleico codificante l'anticorpo anti-BCMA, in condizioni adatte all'espressione dell'anticorpo anti-BCMA e, facoltativamente, il recupero dell'anticorpo anti-BCMA dalla cellula ospite (o dal terreno di coltura della cellula ospite).

Anticorpi a dominio singolo anti-CD38

Vengono qui presentati come riferimento anticorpi a dominio singolo isolati che si legano specificamente a CD38, come CD38 umano. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 modula l'attività di CD38. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è un anticorpo antagonista.

CD38 è una glicoproteina transmembrana di tipo II che si associa ai recettori di superficie cellulare, regola il flusso di Ca²⁺ citoplasmatico e media la trasduzione del segnale nelle cellule linfoidi e mieloidi (Konopleva et al., J Immunol, 161:4702-8, 1998; Deaglio et al., Blood, 109:5390-8, 2007).

CD38 umano è espresso in modo elevato e uniforme sulle cellule del mieloma ed è espresso a livelli relativamente bassi nelle normali cellule linfoidi e mieloidi e in alcuni tessuti di origine non ematopoietica, il che lo rende un potenziale target nel trattamento del mieloma (si veda, ad esempio, Lin et al., Am J Clin Pathol, 2004, 121:482; H. M. Lokhorst et al., New Eng. J. Med., 2015, 373:13).

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 89. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 90. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 91. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 92. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 93. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 94. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 95. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 96. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 97. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 98. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 99. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una, due o tutte e tre le CDR della sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 100. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente almeno una, almeno due o tutte e tre le CDR selezionate tra (a) una CDR1 comprendente una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO: 40-51; (b) una CDR2 comprendente una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO: 52-63; e (c) una CDR3 comprendente una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO: 64-75. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto a una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO:40-51; (b) una CDR2 avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto a una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO:52-63; e (c) una CDR3 avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto a una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO:64-75. In alcune forme di realizzazione, una CDR avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% di identità contiene sostituzioni (per esempio sostituzioni conservative), inserzioni o delezioni rispetto alla sequenza di riferimento, ma l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tale sequenza conserva la capacità di legarsi a CD38. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è maturato per affinità.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 40; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 52; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 64. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 41; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 53; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 65. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 42; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 54; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 66. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 43; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 55; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 67. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 44; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 56; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 68. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 45; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 57; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 69. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 46; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 58; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 70. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 47; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 59; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 71. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 48; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 60; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 72. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 49; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 61; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 73. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 50; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 62; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 74. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 51; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 63; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 75. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è camelide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 è umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende un quadro umano accettore, per esempio un quadro immunoglobulinico umano o un quadro consensuale umano.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente un dominio V_HH avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto a una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO: 89-100. In alcune forme di realizzazione, una sequenza V_HH avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% di identità contiene sostituzioni (per esempio sostituzioni conservative), inserzioni o delezioni rispetto alla sequenza di riferimento, ma l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente tale sequenza conserva la capacità di legarsi a CD38. In alcune forme di realizzazione, da 1 a 10 amminoacidi in totale sono stati sostituiti, inseriti e/o eliminati in una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO: 89-100. In alcune forme di realizzazione, le sostituzioni,

le inserzioni o le delezioni si verificano in regioni esterne alle CDR (vale a dire nelle FR). Facoltativamente, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprende una sequenza amminoacidica selezionata da SEQ ID NO: 89-100, incluse le modifiche post-traduzionali di tale sequenza.

In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 89. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 89. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 90. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 90. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 91. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 91. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 92. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 92. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 93. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 93. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 94. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 94. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 95. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 95. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 96. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 96. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 97. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 97. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 98. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione

comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 98. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 99. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 99. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente un dominio V_HH avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 100. In alcune forme di realizzazione, il CAR dell'invenzione comprende un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 100.

In alcuni esempi, gli epitopi funzionali possono essere mappati mediante scansione di alanina combinatoriale. In questo processo, una strategia di scansione di alanina combinatoriale può essere utilizzata per identificare gli amminoacidi nella proteina CD38 che sono necessari per l'interazione con gli anticorpi a dominio singolo anti-CD38. In alcuni esempi, l'epitopo è conformazionale e può essere impiegata la struttura cristallina dell'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 legato a CD38 per identificare gli epitopi. In alcuni esempi, vi è un anticorpo che si lega specificamente allo stesso epitopo di uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo anti-CD38 qui forniti. Ad esempio, in alcuni esempi vi è un anticorpo che si lega allo stesso epitopo di un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una qualsiasi delle sequenze amminoacidiche di SEQ ID NO: 90-100. Viene presentato come riferimento un anticorpo anti-CD38, o un suo frammento legante l'antigene, che si lega specificamente a CD38 in modo competitivo con uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo anti-CD38 qui descritti. In alcuni esempi, il legame competitivo può essere determinato utilizzando un saggio ELISA. Ad esempio, in alcuni esempi, vi è un anticorpo che si lega specificamente a CD38 in modo competitivo con un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 comprendente una qualsiasi delle sequenze amminoacidiche di SEQ ID NO: 89-100.

Viene presentato come riferimento un anticorpo anti-CD38 o una proteina legante l'antigene comprendente uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo anti-CD38 descritti sopra. In alcuni esempi, l'anticorpo anti-CD38 è un anticorpo monoclonale, incluso un anticorpo camelide, chimerico, umanizzato o umano. In alcuni esempi, l'anticorpo anti-CD38 è un frammento di anticorpo, per esempio un frammento V_HH. In alcuni esempi, l'anticorpo anti-CD38 è un anticorpo a sola catena pesante a lunghezza intera comprendente una regione Fc di qualsiasi classe o isotipo anticorpale, come IgG1 o IgG4. In alcuni esempi, la regione Fc ha una funzione effettrice ridotta o minimizzata.

Un anticorpo anti-CD38 (come un anticorpo a dominio singolo anti-CD38) o una proteina legante l'antigene può incorporare una qualsiasi delle caratteristiche, singolarmente o in combinazione, descritte nelle Sezioni 1-7 di "Caratteristiche degli anticorpi" di seguito.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante gli anticorpi a dominio singolo anti-CD38 compresi nel CAR dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante un anticorpo a dominio singolo anti-CD38, in cui

l'acido nucleico comprende una sequenza avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto a una sequenza di acido nucleico selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 114-125. In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato comprendente una sequenza di acido nucleico selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 114-125. In alcune forme di realizzazione, è fornito un vettore (per esempio un vettore di espressione) comprendente tale acido nucleico. In alcune forme di realizzazione, è fornita una cellula ospite comprendente tale acido nucleico. Viene divulgato un metodo di produzione di un anticorpo anti-CD38, in cui il metodo comprende la coltura di una cellula ospite comprendente un acido nucleico codificante l'anticorpo anti-CD38, in condizioni adatte all'espressione dell'anticorpo anti-CD38, e facoltativamente il recupero dell'anticorpo anti-CD38 dalla cellula ospite (o dal terreno di coltura della cellula ospite).

Caratteristiche degli anticorpi

1. Affinità Anticorpale

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo ha una costante di dissociazione (Kd) di $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (*ad esempio* 10^{-8} M o meno, *ad esempio* da 10^{-8} M a 10^{-13} M , *ad esempio* da 10^{-9} M a 10^{-13} M).

La Kd può essere misurata mediante un saggio di legame con l'antigene radiomarcato (RIA) eseguito con la versione Fab o il frammento V_HH di un anticorpo di interesse e il suo antigene, come descritto dal seguente saggio. Ad esempio, l'affinità di legame in soluzione delle Fab per l'antigene viene misurata equilibrando la Fab con una concentrazione minima di antigene marcato con (¹²⁵I) in presenza di una serie di titolazioni di antigene non marcato, quindi catturando l'antigene legato con una piastra rivestita di anticorpo anti-Fab (vedere, *ad esempio*, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Per stabilire le condizioni per il saggio, le piastre multipozzetto MICROTITER® (Thermo Scientific) vengono rivestite per una notte con 5 µg/ml di un anticorpo catturante anti-Fab (Cappel Labs) in carbonato di sodio 50 mM (pH 9,6) e successivamente bloccate con il 2% (p/v) di sieroalbumina bovina in PBS per due-cinque ore a temperatura ambiente (circa 23°C). In una piastra non adsorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM di [¹²⁵I]-antigene sono mescolati con diluizioni seriali di un Fab di interesse (*ad esempio*, in linea con la valutazione dell'anticorpo anti-VEGF, Fab-12, in Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Il Fab di interesse viene quindi incubato per una notte; tuttavia, l'incubazione può continuare per un periodo più lungo (*ad esempio*, circa 65 ore) per garantire il raggiungimento dell'equilibrio. Successivamente, le miscele vengono trasferite sulla piastra di cattura per essere incubate a temperatura ambiente (*ad esempio*, per un'ora). La soluzione viene quindi rimossa e la piastra viene lavata otto volte con polisorbato 20 allo 0,1% (TWEEN-20®) in PBS. Quando le piastre si sono asciugate, si aggiungono 150 µl/pozzetto di scintillante (MICROSCINT-20™; Packard) e le piastre vengono contate su un contatore gamma TOPCOUNT™ (Packard) per dieci minuti. Le

concentrazioni di ciascuna Fab che danno meno del 20% del legame massimo sono scelte per l'uso nei saggi di legame competitivo.

La Kd può essere misurata con saggi di risonanza plasmonica di superficie utilizzando un BIAcore®-2000 o un BIAcore®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chip di antigene CM5 immobilizzato a ~10 unità di risposta (RU). In breve, i chip biosensori di destrano carbossimetilato (CM5, BIAcore, Inc.) sono stati attivati con *N-etil-N'*-(3-dimetilamminopropil)-carbodiimmide cloridrato (EDC) e *N*-idrossisuccinimide (NHS) secondo le istruzioni del fornitore. L'antigene viene diluito con acetato di sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) prima dell'iniezione a una velocità di flusso di 5 µl/minuto per ottenere circa 10 unità di risposta (RU) di proteina accoppiata. Dopo l'iniezione dell'antigene, viene iniettata etanolamina 1 M per bloccare i gruppi non reagenti. Per le misurazioni cinetiche, diluizioni seriali di due volte di Fab o V_{HH} dell'anticorpo di interesse (da 0,78 nM a 500 nM) vengono iniettate in PBS con tensioattivo allo 0,05% di polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) a 25°C a una velocità di flusso di circa 25 µl/min. Le velocità di associazione (k_{on}) e di dissociazione (k_{off}) sono state calcolate utilizzando un semplice modello di legame Langmuir one-to-one (BIAcore® Evaluation Software versione 3.2) adattando simultaneamente i sensorigrammi di associazione e dissociazione. La costante di dissociazione all'equilibrio (Kd) è calcolata come il rapporto k_{off}/k_{on} . Vedere, *ad esempio*, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Se l'on-rate supera $10^6 M^{-1}s^{-1}$ con il saggio di risonanza plasmonica di superficie di cui sopra, l'on-rate può essere determinato utilizzando una tecnica di quenching fluorescente che misura l'aumento o la diminuzione dell'intensità dell'emissione di fluorescenza (eccitazione = 295 nm; emissione = 340 nm, banda passante di 16 nm) a 25°C di un anticorpo anti-antigene 20 nM (forma Fab) in PBS, pH 7.2, in presenza di concentrazioni crescenti di antigene, misurate in uno spettrometro, come quello dotato di stop-flow (Aviv Instruments) o uno spettrofotometro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cuvetta agitata.

2. Frammenti Anticorpali

In alcuni esempi, un anticorpo qui descritto è un frammento di anticorpo. I frammenti di anticorpi includono, ma non solo, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv e frammenti scFv, V_{HH}, e altri frammenti descritti di seguito. Per una revisione di alcuni frammenti di anticorpi, vedere Hudson *et al.* *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003). Per una rassegna dei frammenti scFv, vedere, *ad esempio*, Pluckthün, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore ed., (Springer-Verlag, New York), pagg. 269-315 (1994)); vedere anche WO 93/16185 e i Brevetti U.S. n. 5,571,894 e 5,587,458. Per la discussione di frammenti Fab e F(ab')₂ comprendenti residui di epitopo di legame al recettore di recupero e aventi un'emivita aumentata in vivo, vedere il Brevetto U.S. n. 5,869,046.

I diacorpi sono frammenti di anticorpi con due siti di legame con l'antigene che possono essere bivalenti o bispecifici. Vedere, *ad esempio*, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). I triacorpi

e i tetracorpi sono descritti anche in Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

I frammenti di anticorpi possono essere prodotti con varie tecniche, tra cui, a titolo esemplificativo, la digestione proteolitica di un anticorpo intatto e la produzione da parte di cellule ospiti ricombinanti (*ad esempio*, *E. coli* o fagi), come descritto nel presente documento.

3. Anticorpi Chimerici e Umanizzati

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo è un anticorpo chimerico. Alcuni anticorpi chimerici sono descritti, *ad esempio*, nel Brevetto U.S. n. 4,816,567; e in Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984). In un esempio, un anticorpo chimerico comprende una regione variabile non umana (*ad esempio*, una regione variabile derivata da una specie camelide, come il lama) e una regione costante umana. In un altro esempio, un anticorpo chimerico è un anticorpo "class switched" in cui la classe o la sottoclasse è stata modificata rispetto a quella dell'anticorpo parentale. Gli anticorpi chimerici includono frammenti che legano l'antigene.

In alcune forme di realizzazione, un anticorpo chimerico è un anticorpo umanizzato. In genere, un anticorpo non umano viene umanizzato per ridurre l'immunogenicità per gli esseri umani, pur mantenendo la specificità e l'affinità dell'anticorpo non umano parentale. In genere, un anticorpo umanizzato comprende uno o più domini variabili in cui le HVR, *ad esempio* le CDR, (o porzioni di esse) sono derivate da un anticorpo non umano e le FR (o porzioni di esse) sono derivate da sequenze di anticorpi umani. Un anticorpo umanizzato può comprendere anche almeno una parte di una regione costante umana. In alcune forme di realizzazione, alcuni residui FR in un anticorpo umanizzato sono sostituiti con residui corrispondenti di un anticorpo non umano (*ad esempio*, l'anticorpo da cui derivano i residui HVR), *ad esempio* per ripristinare o migliorare la specificità o l'affinità dell'anticorpo.

Gli anticorpi umanizzati e i metodi per realizzarli sono esaminati, *ad esempio*, in Almagro e Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) e sono ulteriormente descritti, *ad esempio*, in Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); nei Brevetti US n. 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, e 7,087,409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (che descrive l'innesto SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (che descrive il "resurfacing"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (che descrive il "rimiscelamento FR"); e Osbourn et al., *Metodi* 36:61-68 (2005) e Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (che descrivono l'approccio di "selezione guidata" al rimiscelamento delle FR).

Le regioni quadro umane che possono essere utilizzate per l'umanizzazione includono, ma non sono limitate a: regioni quadro selezionate con il metodo del "best-fit" (*vedere, ad esempio*, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regioni quadro derivate dalla sequenza di consenso degli anticorpi umani di un particolare sottogruppo di regioni variabili della catena leggera o pesante (*vedere, ad esempio*, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

89:4285 (1992); e Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regioni quadro umane mature (somaticamente mutate) o regioni quadro umane germinali (vedere, *ad esempio*, Almagro e Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); e regioni quadro derivate dallo screening di librerie FR (vedere, *ad esempio*, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) e Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi a dominio singolo sono modificati, ad esempio umanizzati, senza diminuire l'affinità nativa del dominio per l'antigene e riducendo la sua immunogenicità rispetto a una specie eterologa. Ad esempio, è possibile determinare i residui amminoacidici del dominio variabile dell'anticorpo ($V_{\text{H}}\text{H}$) di un anticorpo di lama e sostituire uno o più amminoacidi camelidi, ad esempio nelle regioni di struttura, con la loro controparte umana presente nella sequenza di consenso umana, senza che il polipeptide perda le sue caratteristiche tipiche, *ossia* che l'umanizzazione non influisca significativamente sulla capacità di legare l'antigene del polipeptide risultante. L'umanizzazione degli anticorpi a dominio singolo dei camelidi richiede l'introduzione e la mutagenesi di una quantità limitata di amminoacidi in una singola catena polipeptidica. Ciò è in contrasto con l'umanizzazione di scFv, Fab', (Fab')₂ e IgG, che richiede l'introduzione di modifiche amminoacidiche in due catene, la catena leggera e quella pesante, e la conservazione dell'assemblaggio di entrambe le catene.

Gli anticorpi a dominio singolo che comprendono un dominio $V_{\text{H}}\text{H}$ possono essere umanizzati per avere sequenze simili a quelle umane. In alcune forme di realizzazione, le regioni FR del dominio $V_{\text{H}}\text{H}$ qui utilizzate presentano almeno il 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o più di omologia di sequenza amminoacidica con le regioni quadro V_{H} umane. Una classe esemplificativa di domini $V_{\text{H}}\text{H}$ umanizzati è caratterizzata dal fatto che i $V_{\text{H}}\text{H}$ recano un amminoacido del gruppo costituito da glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptofano, metionina, serina, treonina, asparagina o glutammina in posizione 45, come, ad esempio, L45 e un triptofano in posizione 103, secondo la numerazione di Kabat. I polipeptidi appartenenti a questa classe presentano un'elevata omologia di sequenza amminoacidica con le regioni quadro V_{H} umane e possono essere somministrati direttamente agli esseri umani senza aspettarsi una risposta immunitaria indesiderata e senza l'onere di un'ulteriore umanizzazione.

Un'altra classe esemplificativa di anticorpi umanizzati a dominio singolo dei camelidi è stata descritta in WO 03/035694 e contiene residui idrofobici FR2 tipicamente presenti negli anticorpi convenzionali di origine umana o di altre specie, ma compensa questa perdita di idrofilia con un residuo di arginina carico in posizione 103 che sostituisce il residuo triptofano conservato presente ne V_{H} degli anticorpi a doppia catena. Come tali, i peptidi appartenenti a queste due classi mostrano un'elevata omologia di sequenza amminoacidica con le regioni quadro V_{H} umane e tali peptidi potrebbero essere somministrati direttamente agli esseri umani senza aspettarsi una risposta immunitaria indesiderata e senza l'onere di un'ulteriore umanizzazione.

4. Anticorpi umani

Un anticorpo può essere un anticorpo umano. Gli anticorpi umani possono essere prodotti con varie tecniche note nella tecnica. Gli anticorpi umani sono descritti in generale in van Dijk e van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) e Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008). Topi o ratti transgenici in grado di produrre anticorpi a dominio singolo completamente umani sono noti nella tecnica. Vedere, *ad esempio*, US20090307787A1, il Brevetto U.S. n. 8,754,287, US20150289489A1, US20100122358A1, e WO2004049794.

Gli anticorpi umani possono essere preparati somministrando un immunogeno a un animale transgenico che è stato modificato per produrre anticorpi umani intatti o anticorpi intatti con regioni variabili umane in risposta a una stimolazione antigenica. Questi animali contengono tipicamente tutti o una parte dei loci immunoglobulinici umani, che sostituiscono i loci immunoglobulinici endogeni, o che sono presenti in modo extracromosomico o integrati in modo casuale nei cromosomi dell'animale. In questi topi transgenici, i loci endogeni di immunoglobuline sono stati generalmente inattivati. Per una rassegna dei metodi per ottenere anticorpi umani da animali transgenici, vedere Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Vedere anche, *ad esempio*, i Brevetti U.S. n. 6,075,181 e 6,150,584 che descrivono la tecnologia XENOMUSE™; il Brevetto U.S. n. 5,770,429 che descrive la tecnologia HUMAB®; il Brevetto U.S. n. 7,041,870 che descrive la tecnologia K-M MOUSE®, e la Pubblicazione della Domanda di Brevetto U.S. n. US 2007/0061900 che descrive la tecnologia VELOCIMOUSE®). Le regioni variabili umane degli anticorpi intatti generati da tali animali possono essere ulteriormente modificate, *ad esempio* combinandole con una diversa regione costante umana.

Gli anticorpi umani possono essere prodotti anche con metodi basati su ibridomi. Sono state descritte linee cellulari di mieloma umano e di eteromieloma topo-umano per la produzione di anticorpi monoclonali umani. (Vedere, *ad esempio*, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pagg. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); e Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Gli anticorpi umani generati attraverso la tecnologia dell'ibridoma delle cellule B umane sono descritti anche in Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Ulteriori metodi sono quelli descritti, *ad esempio*, in Brevetto U.S. n. 7,189,826 (che descrive la produzione di anticorpi monoclonali umani IgM da linee cellulari di ibridoma) e Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (che descrive gli ibridomi umano-umano). La tecnologia degli ibridomi umani (tecnologia Trioma) è descritta anche in Vollmers e Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) e Vollmers e Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3): 185-91 (2005).

Gli anticorpi umani possono essere generati anche isolando sequenze di domini variabili di cloni Fv selezionati da librerie di visualizzazione fago di derivazione umana. Tali sequenze di domini variabili possono essere combinate con un dominio costante umano desiderato. Le tecniche di selezione

degli anticorpi umani dalle librerie di anticorpi sono descritte di seguito.

Una tecnica per ottenere sequenze V_{HH} dirette contro un particolare antigene o target prevede di immunizzare opportunamente un mammifero transgenico in grado di esprimere anticorpi a catena pesante (ad esempio, in modo da suscitare una risposta immunitaria e/o anticorpi a catena pesante diretti contro detto antigene o target), ottenendo da detto mammifero transgenico un campione biologico idoneo che contenga (sequenze di acido nucleico codificanti) dette sequenze V_{HH} (ad esempio un campione di sangue, di siero o di cellule B), e quindi generando sequenze V_{HH} dirette contro detto antigene o target, a partire da detto campione, utilizzando qualsiasi tecnica idonea di per sé nota (ad esempio uno dei metodi qui descritti o una tecnica di ibridazione). A questo scopo, ad esempio, i topi che esprimono gli anticorpi della catena pesante e gli ulteriori metodi e tecniche descritti in WO 02/085945, WO 04/049794 e WO 06/008548 e Janssens et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 10 ott. 2006; 103(41):15130-5 possono essere utilizzati. Ad esempio, questi topi che esprimono anticorpi a catena pesante possono esprimere anticorpi a catena pesante con qualsiasi dominio (singolo) variabile adatto, come domini (singoli) variabili provenienti da fonti naturali (*ad esempio* domini (singoli) variabili umani, domini (singoli) variabili di camelidi o domini (singoli) variabili di squali), nonché ad esempio domini (singoli) variabili sintetici o semisintetici.

5. Anticorpi Derivati dalla Libreria

Gli anticorpi possono essere isolati mediante lo screening di librerie combinatoriali alla ricerca di anticorpi con l'attività o le attività desiderate. Ad esempio, sono noti nella tecnica diversi metodi per la generazione di librerie di phage display e per lo screening di tali librerie alla ricerca di anticorpi che possiedono le caratteristiche di legame desiderate. Tali metodi sono esaminati, *ad esempio*, in Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) e ulteriormente descritti, *ad esempio*, in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37) e ulteriormente descritto, *ad esempio*, in McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks e Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); e Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004). Sono stati descritti metodi per la costruzione di librerie di anticorpi a dominio singolo, ad esempio, vedere il Brevetto U.S. n. 7371849.

In alcuni metodi di visualizzazione dei fagi, i repertori dei geni V_H e V_L vengono clonati separatamente mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) e ricombinati in modo casuale in librerie di fagi, che possono poi essere sottoposte a screening per individuare i fagi che legano l'antigene, come descritto in Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). I fagi mostrano tipicamente frammenti di anticorpi, sia come frammenti Fv a catena singola (scFv) sia come frammenti Fab. Le librerie provenienti da fonti immunizzate forniscono anticorpi ad alta affinità con l'immunogeno

senza la necessità di costruire ibridomi. In alternativa, il repertorio naïve può essere clonato (*ad esempio*, dagli esseri umani) per fornire un'unica fonte di anticorpi contro un'ampia gamma di antigeni non-self e anche self senza alcuna immunizzazione, come descritto da Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Infine, le librerie naïve possono anche essere realizzate sinteticamente clonando segmenti di gene V non riarrangiati da cellule staminali e utilizzando primer PCR contenenti sequenze casuali per codificare le regioni CDR3 altamente variabili e realizzare il riarrangiamento *in vitro*, come descritto da Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Le pubblicazioni di brevetto che descrivono librerie fagiche di anticorpi umani includono, ad esempio: il Brevetto US n. 5,750,373, e le Pubblicazioni di Brevetto US n. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, e 2009/0002360.

Gli anticorpi o i frammenti di anticorpi isolati da librerie di anticorpi umani sono considerati anticorpi umani o frammenti di anticorpi umani.

6. Anticorpi Multispecifici

Un anticorpo può essere un anticorpo multispecifico, *ad esempio* un anticorpo bispecifico. Gli anticorpi multispecifici sono anticorpi che hanno specificità di legame per almeno due siti diversi. Una delle specificità di legame può essere per un antigene selezionato dal gruppo costituito da CD19, CD20, BCMA e CD38, mentre l'altra è per qualsiasi altro antigene. Gli anticorpi bispecifici possono legarsi a due diversi epitopi di un antigene selezionato dal gruppo costituito da CD19, CD20, BCMA e CD38. Gli anticorpi bispecifici possono essere utilizzati anche per localizzare gli agenti citotossici nelle cellule che esprimono un antigene selezionato dal gruppo costituito da CD19, CD20, BCMA e CD38.

Gli anticorpi bispecifici possono essere preparati come anticorpi completi o frammenti di anticorpi. Le tecniche per la produzione di anticorpi multispecifici includono, ma non sono limitate a, la coespressione ricombinante di due coppie di catene pesanti e leggere di immunoglobuline con specificità diverse (vedere Milstein e Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, e Traunecker et al., *EMBO J*. 10: 3655 (1991)), e l'ingegneria "knob-in-hole" (vedere, *ad esempio*, il Brevetto U.S. n. 5,731,168). Gli anticorpi multi-specifici possono essere realizzati anche mediante l'ingegnerizzazione degli effetti di guida elettrostatica per la creazione di molecole eterodimeriche Fc (WO 2009/089004A1); la reticolazione di due o più anticorpi o frammenti (vedere, *ad esempio*, il Brevetto US n. 4,676,980, e Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); l'utilizzo di cerniere di leucina per produrre anticorpi bi-specifici (vedere, *ad esempio*, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); l'utilizzo della tecnologia dei "diacorpi" per la produzione di frammenti di anticorpi bispecifici (vedere, *ad esempio*, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); e l'utilizzo di dimeri di Fv a catena singola (sFv) (vedere, *ad esempio*, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); e la preparazione di anticorpi trispecifici come descritto, *ad esempio*, in Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991); e la creazione di polipeptidi che comprendono anticorpi a dominio singolo in tandem (vedere, *ad esempio*, la Domanda di Brevetto U.S. n. 20110028695; e Conrath et al. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276(10):7346-

50). Sono inclusi anche anticorpi ingegnerizzati con tre o più siti funzionali di legame con l'antigene, compresi gli "anticorpi Octopus" (*vedere, ad esempio, US 2006/0025576A1*).

7. Varianti Anticorpali

In alcune forme di realizzazione, sono contemplate varianti di sequenza amminoacidica degli anticorpi. Ad esempio, può essere auspicabile migliorare l'affinità di legame e/o altre proprietà biologiche dell'anticorpo. Varianti di sequenza amminoacidica di un anticorpo possono essere preparate introducendo opportune modifiche nella sequenza di acido nucleico che codifica l'anticorpo o mediante sintesi di peptidi. Tali modifiche includono, ad esempio, delezioni e/o inserzioni e/o sostituzioni di residui all'interno delle sequenze amminoacidiche dell'anticorpo. Per ottenere il costrutto finale è possibile effettuare qualsiasi combinazione di delezioni, inserimenti e sostituzioni, purché il costrutto finale possieda le caratteristiche desiderate, *ad esempio il legame con l'antigene*.

a) Varianti di Sostituzione, Inserzione e Delezione

In alcune forme di realizzazione, sono disponibili varianti di anticorpi con una o più sostituzioni amminoacidiche. I siti di interesse per la mutagenesi sostitutiva includono le HVR e le FR. Le sostituzioni conservative sono riportate nella Tabella 3 sotto il titolo "Sostituzioni preferite". Modifiche più sostanziali sono riportate nella Tabella 3, sotto il titolo "sostituzioni esemplificative", e come ulteriormente descritto di seguito in riferimento alle classi di catene laterali degli amminoacidi. Le sostituzioni amminoacidiche possono essere introdotte in un anticorpo di interesse e i prodotti possono essere sottoposti a screening per verificare l'attività desiderata, *ad esempio il mantenimento/miglioramento del legame con l'antigene, la diminuzione dell'immunogenicità o il miglioramento della ADCC o della CDC*.

TABELLA 3. Sostituzioni Amminoacidiche

Residuo originale	Sostituzioni esemplificative	Sostituzioni preferite
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe

Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu
---------	-------------------------------------	-----

Gli amminoacidi possono essere raggruppati in base alle proprietà comuni delle catene laterali:

- (1) idrofobo: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) idrofilo neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) acidico: Asp, Glu;
- (4) di base: His, Lys, Arg;
- (5) residui che influenzano l'orientamento della catena: Gly, Pro;
- (6) aromatico: Trp, Tyr, Phe.

Le sostituzioni non-conservative comportano lo scambio di un membro di una di queste classi con un'altra classe.

Un tipo di variante sostitutiva prevede la sostituzione di uno o più residui della regione ipervariabile di un anticorpo genitore (*ad esempio*, un anticorpo umanizzato o umano). In genere, la variante o le varianti selezionate per ulteriori studi presenteranno modifiche (*ad esempio*, miglioramenti) in alcune proprietà biologiche (*ad esempio*, maggiore affinità, ridotta immunogenicità) rispetto all'anticorpo progenitore e/o avranno sostanzialmente mantenuto alcune proprietà biologiche dell'anticorpo progenitore. Una variante sostitutiva esemplificativa è un anticorpo maturato per affinità, che può essere opportunamente generato, *ad esempio*, utilizzando tecniche di maturazione per affinità basate su phage display, come quelle qui descritte. In breve, uno o più residui HVR possono essere mutati e gli anticorpi varianti possono essere visualizzati su fagi e sottoposti a screening per una particolare attività biologica (*ad esempio*, l'affinità di legame).

Nelle HVR possono essere apportate alterazioni (*ad esempio*, sostituzioni), *ad esempio* per migliorare l'affinità degli anticorpi. Tali alterazioni possono essere apportate negli "hotspot" HVR, *vale a dire* residui codificati da codoni che subiscono mutazioni ad alta frequenza durante il processo di maturazione somatica (*vedere, ad esempio*, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), e/o SDR (a-CDR), con la variante V_H o V_L risultante che viene testata per l'affinità di legame. La maturazione per affinità mediante la costruzione e la rifelezione da librerie secondarie è stata descritta, *ad esempio*, in Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).)

In alcune forme di realizzazione di maturazione dell'affinità, la diversità viene introdotta nei geni variabili scelti per la maturazione mediante una varietà di metodi (*ad esempio*, PCR a prova di errore, shuffling delle catene o mutagenesi oligonucleotide-diretta). Viene quindi creata una libreria secondaria. La libreria viene quindi sottoposta a screening per identificare eventuali varianti di anticorpi con l'affinità desiderata. Un altro metodo per introdurre la diversità prevede approcci HVR-diretti, in cui diversi residui HVR (*ad esempio*, 4-6 residui alla volta) vengono randomizzati. I residui

HVR coinvolti nel legame con l'antigene possono essere identificati in modo specifico, *ad esempio*, utilizzando la mutagenesi a scansione dell'alanina o la modellazione. In particolare, i CDR-H3 e i CDR-L3 sono spesso presi di mira.

In alcune forme di realizzazione, possono verificarsi sostituzioni, inserzioni o delezioni all'interno di uno o più HVR, purché tali alterazioni non riducano sostanzialmente la capacità dell'anticorpo di legare l'antigene. Ad esempio, è possibile apportare alle HVR alterazioni conservative (*ad esempio*, sostituzioni conservative come quelle fornite nel presente documento) che non riducono sostanzialmente l'affinità di legame. Tali alterazioni possono trovarsi al di fuori degli "hotspot" HVR o delle CDR. In alcune forme di realizzazione di sequenze V_HH varianti fornite sopra, ogni HVR è inalterata o non contiene più di una, due o tre sostituzioni amminoacidiche.

Un metodo utile per identificare i residui o le regioni di un anticorpo che possono essere oggetto di mutagenesi è chiamato "mutagenesi a scansione di alanina", come descritto da Cunningham e Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. In questo metodo, un residuo o un gruppo di residui target (*ad esempio*, residui carichi come Arg, Asp, His, Lys e Glu) vengono identificati e sostituiti con un amminoacido neutro o carico negativamente (*ad esempio*, alanina o polialanina) per determinare se l'interazione dell'anticorpo con l'antigene è influenzata. Ulteriori sostituzioni possono essere introdotte nelle posizioni degli amminoacidi che dimostrano una sensibilità funzionale alle sostituzioni iniziali.

In alternativa o in aggiunta, una struttura cristallina di un complesso antigene-anticorpo per identificare i punti di contatto tra l'anticorpo e l'antigene. Tali residui di contatto e i residui vicini possono essere mirati o eliminati come candidati alla sostituzione. Le varianti possono essere sottoposte a screening per determinare se contengono le proprietà desiderate.

Le inserzioni di sequenze amminoacidiche comprendono fusioni ammino- e/o carbossi-terminali di lunghezza variabile da un solo residuo a polipeptidi contenenti un centinaio o più di residui, nonché inserzioni intrasequenziali di residui amminoacidici singoli o multipli. Esempi di inserzioni terminali includono un anticorpo con un residuo metionile terminale N. Altre varianti inserzionali della molecola dell'anticorpo includono la fusione del suo terminale N o del terminale C con un enzima (*ad esempio*, per l'ADEPT) o un polipeptide che aumenta l'emivita sierica dell'anticorpo.

b) Varianti di glicosilazione

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo viene modificato per aumentare o diminuire la misura in cui l'anticorpo è glicosilato. L'aggiunta o la delezione di siti di glicosilazione a un anticorpo può essere ottenuta modificando la sequenza amminoacidica in modo da creare o rimuovere uno o più siti di glicosilazione.

Se l'anticorpo comprende una regione Fc, il carboidrato ad essa collegato può essere modificato. Gli anticorpi nativi prodotti da cellule di mammifero comprendono tipicamente un oligosaccaride ramificato e biantennario che è generalmente legato da un legame N ad Asn297 del dominio CH2 della

regione Fc. *Vedere, ad esempio*, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). L'oligosaccaride può includere vari carboidrati, *ad esempio* mannosio, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galattosio e acido sialico, nonché un fucosio attaccato a un GlcNAc nel "gambo" della struttura oligosaccaridica biantennaria. In alcune forme di realizzazione, è possibile modificare l'oligosaccaride di un anticorpo per creare varianti di anticorpi con determinate proprietà migliorate.

In alcune forme di realizzazione, le varianti anticorpali hanno una struttura carboidratica priva di fucosio attaccato (direttamente o indirettamente) a una regione Fc. Ad esempio, la quantità di fucosio in tale anticorpo può essere compresa tra l'1% e l'80%, tra l'1% e il 65%, tra il 5% e il 65% o tra il 20% e il 40%. La quantità di fucosio è determinata calcolando la quantità media di fucosio all'interno della catena zuccherina in corrispondenza di Asn297, rispetto alla somma di tutte le glicostrutture attaccate ad Asn 297 (*ad esempio*, strutture complesse, ibride e ad alto contenuto di mannosio) misurate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF, come descritto in WO 2008/077546, ad esempio. Asn297 si riferisce al residuo di asparagina localizzato in posizione 297 circa nella regione Fc (numerazione UE dei residui della regione Fc); tuttavia, Asn297 può anche essere localizzato circa ± 3 amminoacidi a monte o a valle della posizione 297, *vale a dire* tra le posizioni 294 e 300, a causa di piccole variazioni di sequenza negli anticorpi. Tali varianti di fucosilazione potrebbero aver migliorato la funzione ADCC. *Vedere, ad esempio*, la Pubblicazione di Brevetto US n. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Esempi di pubblicazioni relative a varianti di anticorpi "defucosilati" o "carenti di fucosio" includono: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Esempi di linee cellulari in grado di produrre anticorpi defucosilati sono le cellule CHO Lec13, carenti nella fucosilazione delle proteine (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); la Domanda di Brevetto US n. US 2003/0157108 A1, Presta, Le WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, in particolare all'Esempio 11), e linee cellulari knockout, come le cellule CHO knockout del gene dell'alfa-1,6-fucosiltransferasi, *FUT8* (*vedere, ad esempio*, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); e WO2003/085107).

Esistono inoltre varianti di anticorpi con oligosaccaridi bisecati, *ad esempio* in cui un oligosaccaride biantennario attaccato alla regione Fc dell'anticorpo è bisecato da GlcNAc. Tali varianti di anticorpi possono presentare una ridotta fucosilazione e/o una migliore funzione ADCC. Esempi di tali varianti di anticorpi sono descritti, *ad esempio*, in WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); nel Brevetto US n. 6,602,684 (Umana et al.); e in US 2005/0123546 (Umana *et al.*). Sono disponibili anche varianti di anticorpi con almeno un residuo di galattosio nell'oligosaccaride collegato alla

regione Fc. Tali varianti anticorpali possono aver migliorato la funzione del CDC. Tali varianti di anticorpi sono descritte, *ad esempio*, in WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); e WO 1999/22764 (Raju, S.).

c) Varianti della regione Fc

Una o più modifiche amminoacidiche possono essere introdotte nella regione Fc di un anticorpo, generando così una variante della regione Fc. La variante della regione Fc può comprendere una sequenza della regione Fc umana (*ad esempio*, una regione Fc IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 umana) che comprende una modifica amminoacidica (*per esempio* una sostituzione) in una o più posizioni amminoacidiche.

Una variante anticorpale può possedere alcune funzioni effettrici ma non tutte, il che la rende un candidato desiderabile per applicazioni in cui l'emivita dell'anticorpo *in vivo* è importante ma alcune funzioni effettrici (come quelle del complemento e dell'ADCC) sono inutili o deleterie. Per confermare la riduzione/depressione delle attività CDC e/o ADCC, si possono condurre saggi di citotossicità *in vitro* e/o *in vivo*. Ad esempio, è possibile eseguire saggi di legame con il recettore Fc (FcR) per garantire che l'anticorpo non si leghi a Fc γ R (e quindi probabilmente non abbia attività ADCC), ma mantenga la capacità di legarsi a FcRn. Le cellule primarie per la mediazione dell'ADCC, le cellule NK, esprimono solo Fc(RIII), mentre i monociti esprimono Fc(RI, Fc(RII e Fc(RIII). L'espressione di FcR sulle cellule ematopoietiche è riassunta nella Tabella 3 a pagina 464 di Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Esempi non limitativi di saggi *in vitro* per valutare l'attività ADCC di una molecola di interesse sono descritti nel Brevetto U.S. n. 5,500,362 (*vedere, ad esempio* Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) e in Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (*vedere* Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). In alternativa, si possono impiegare metodi di analisi non radioattivi (*vedere, ad esempio*, ACTI™ non-radioactive cytotoxicity assay for flow cytometry (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; e CytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay (Promega, Madison, WI). Le cellule effettrici utili per tali saggi includono le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) e le cellule Natural Killer (NK). In alternativa o in aggiunta, l'attività ADCC della molecola di interesse può essere valutata *in vivo*, ad esempio in un modello animale come quello descritto in Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Si possono anche eseguire saggi di legame con C1q per confermare che l'anticorpo non è in grado di legare C1q e quindi non ha attività CDC. *Vedere esempio*, ELISA per il legame di C1q e C3c in WO 2006/029879 e WO 2005/100402. Per valutare l'attivazione del complemento, si può eseguire un test CDC (*vedere, ad esempio*, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101: 1045-1052 (2003); e Cragg, M.S. e M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Le determinazioni del legame FcRn e della clearance/mezza vita *in vivo* possono essere eseguite anche con metodi noti nella tecnica (*vedere, ad esempio*, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12): 1759-1769 (2006)). Gli anticorpi con funzione effettrice ridotta includono quelli con sostituzione di uno o più residui della regione Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 e 329

(Brevetto U.S. n. 6,737,056). Tali mutanti Fc includono mutanti Fc con sostituzioni in due o più posizioni amminoacidiche 265, 269, 270, 297 e 327, compreso il cosiddetto mutante Fc "DANA" con sostituzione dei residui 265 e 297 in alanina (Brevetto US n. 7,332,581).

Sono descritte alcune varianti di anticorpi con un legame migliore o minore con gli FcR. (*Vedere, ad esempio*, il Brevetto U.S. n. 6,737,056; WO 2004/056312, e Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

Una variante dell'anticorpo può comprendere una regione Fc con una o più sostituzioni amminoacidiche che migliorano l'ADCC, *ad esempio* sostituzioni nelle posizioni 298, 333 e/o 334 della regione Fc (numerazione UE dei residui).

Nella regione Fc possono essere apportate alterazioni che determinano un legame alterato (*vale a dire* migliore o minore) con C1q e/o la citotossicità dipendente dal complemento (CDC), *ad esempio* come descritto nel Brevetto US n. 6,194,551, in WO 99/51642, e Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Anticorpi con una maggiore emivita e un migliore legame con il recettore Fc neonatale (FcRn), responsabile del trasferimento delle IgG materne al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), sono descritti in US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Questi anticorpi comprendono una regione Fc con una o più sostituzioni che migliorano il legame della regione Fc con FcRn. Tali varianti Fc includono quelle con sostituzioni in uno o più residui della regione Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, *ad esempio* la sostituzione del residuo 434 della regione Fc (Brevetto US n. 7,371,826).

Vedere anche Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); il Brevetto U.S. n. 5,648,260; il Brevetto U.S. n. 5,624,821; e WO 94/29351 per altri esempi di varianti della regione Fc.

d) Varianti di anticorpi ingegnerizzati con cisteina

In alcune forme di realizzazione, può essere auspicabile creare anticorpi ingegnerizzati con cisteina, *ad esempio* "TioMAb", in cui uno o più residui di un anticorpo sono sostituiti con residui di cisteina. In particolare, i residui sostituiti si trovano in siti accessibili dell'anticorpo. Sostituendo questi residui con la cisteina, i gruppi tiolici reattivi si posizionano in siti accessibili dell'anticorpo e possono essere utilizzati per coniugare l'anticorpo con altre società, come le società di farmaci o le società linker-farmaco, per creare un immunoconiugato, come descritto in seguito. In alcune forme di realizzazione, uno o più dei seguenti residui possono essere sostituiti con cisteina: A118 (numerazione UE) della catena pesante; e S400 (numerazione UE) della regione Fc della catena pesante. Gli anticorpi ingegnerizzati con cisteina possono essere generati come descritto, *ad esempio*, nel Brevetto U.S. n. 7,521,541.

e) Derivati Anticorpali

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo può essere ulteriormente modificato per contenere ulteriori società non proteiche note nella tecnica e facilmente disponibili. Le società adatte alla derivatizzazione dell'anticorpo includono, ma non solo, polimeri idrosolubili. Esempi non limitativi di polimeri solubili in acqua includono, ma non sono limitati a, polietilenglicole (PEG), copolimeri di etilenglicole/propilenglicole, carbossimetilcellulosa, destrano, alcool polivinilico, polivinilpirrolidone, poli-1, 3-diossolano, poli-1,3,6-triossano, copolimero etilene/anidride maleica, poliamminoacidi (omopolimeri o copolimeri casuali) e destrano o poli(n-vinilpirrolidone)polietilenglicole, omopolimeri di propilenglicole, copolimeri di polipropilene ossido/ossido di etilene, poliossietilati polioli (*ad esempio* glicerolo), alcool polivinilico e loro miscele. La polietilenglicole propionaldeide può presentare vantaggi nella produzione grazie alla sua stabilità in acqua. Il polimero può avere qualsiasi peso molecolare e può essere ramificato o non ramificato. Il numero di polimeri attaccati all'anticorpo può variare e, se sono attaccati più polimeri, possono essere la stessa molecola o molecole diverse. In generale, il numero e/o il tipo di polimeri utilizzati per la derivatizzazione può essere determinato in base a considerazioni che includono, ma non si limitano a, le particolari proprietà o funzioni dell'anticorpo da migliorare, se il derivato dell'anticorpo sarà utilizzato in una terapia in condizioni definite, *eccetera*.

In alcune forme di realizzazione, esistono coniugati di un anticorpo e di una parte non proteica che possono essere riscaldati selettivamente mediante esposizione a radiazioni. In alcune forme di realizzazione, la parte non proteica è un nanotubo di carbonio (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). Le radiazioni possono essere di qualsiasi lunghezza d'onda e includono, ma non solo, lunghezze d'onda che non danneggiano le cellule ordinarie, ma che riscaldano la frazione non proteica a una temperatura tale da uccidere le cellule prossimali alla frazione anticorpo-non proteica.

Metodi di preparazione

Gli anticorpi (come gli anticorpi a dominio singolo) qui descritti possono essere preparati con qualsiasi metodo noto nella tecnica o come descritto nel presente documento.

Sono stati descritti metodi di preparazione di anticorpi a dominio singolo. Vedere, ad esempio, Els Pardon et al, *Nature Protocol*, 2014; 9(3): 674. Gli anticorpi a dominio singolo (come $V_{\text{H}}\text{H}$) possono essere ottenuti con metodi noti nella tecnica, ad esempio immunizzando una specie di *camelide* (come il cammello o il lama) e ottenendo ibridomi da essa, oppure clonando una libreria di anticorpi a dominio singolo utilizzando tecniche di biologia molecolare note nella tecnica e la successiva selezione mediante ELISA con singoli cloni di librerie non selezionate o utilizzando la visualizzazione fago.

Per la produzione ricombinante degli anticorpi a dominio singolo, gli acidi nucleici che codificano gli anticorpi a dominio singolo vengono isolati e

inseriti in un vettore replicabile per un ulteriore clonaggio (amplificazione del DNA) o per l'espressione. Il DNA che codifica l'anticorpo a dominio singolo è facilmente isolabile e sequenziabile con procedure convenzionali (*ad esempio*, utilizzando sonde oligonucleotidiche in grado di legarsi specificamente ai geni che codificano le catene pesanti e leggere dell'anticorpo). Sono disponibili molti vettori. La scelta del vettore dipende in parte dalla cellula ospite da utilizzare. In genere, le cellule ospiti preferite sono di origine procariotica o eucariotica (generalmente di mammifero).

1. Anticorpi Policlonali

Gli anticorpi policlonali sono generalmente allevati negli animali mediante iniezioni multiple sottocutanee (sc) o intraperitoneali (ip) del relativo antigene e di un adiuvante. Può essere utile coniugare l'antigene in questione con una proteina immunogena nella specie da immunizzare, *ad esempio* l'emocianina di buco della serratura (KLH), la sieralbumina, la tireoglobulina bovina o l'inibitore della tripsina di soia, utilizzando un agente bifunzionale o derivatizzante, *ad esempio*, estere maleimmidobenzoil solfosuccinimide (coniugazione attraverso i residui di cisteina), N-idrossisuccinimide (attraverso i residui di lisina), glutaraldeide, anidride succinica, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, dove R e R^1 sono gruppi alchilici inferiori indipendenti. Esempi di coadiuvanti che possono essere impiegati sono l'adiuvante completo di Freund e l'adiuvante MPL-TDM (monofosforillipide A, trealosio sintetico dicorinomicolato). Il protocollo di immunizzazione può essere scelto da una persona esperta nella tecnica, senza inutili sperimentazioni.

Gli animali vengono immunizzati contro l'antigene, i coniugati immunogenici o i derivati combinando, *ad esempio*, 100 μg o 5 μg della proteina o del coniugato (per conigli o topi, rispettivamente) con 3 volumi di adiuvante completo di Freund e iniettando la soluzione per via intradermica in più punti. Un mese dopo, gli animali vengono potenziati con 1/5 - 1/10 della quantità originale di peptide o coniugato nell'adiuvante completo di Freund mediante iniezione sottocutanea in più siti. Da sette a quattordici giorni dopo, gli animali vengono dissanguati e il siero viene analizzato per verificare il titolo degli anticorpi. Gli animali vengono incrementati fino a quando il titolo non raggiunge il livello massimo. I coniugati possono anche essere prodotti in coltura cellulare ricombinante come fusioni di proteine. Inoltre, agenti aggreganti come l'allume sono adatti a potenziare la risposta immunitaria.

2. Anticorpi Monoclonali

Gli anticorpi monoclonali sono ottenuti da una popolazione di anticorpi sostanzialmente omogenei, vale a dire che i singoli anticorpi che compongono la popolazione sono identici, ad eccezione di possibili mutazioni naturali e/o modifiche post-traduzionali (*ad esempio*, isomerizzazioni, amidazioni) che possono essere presenti in quantità minori. Pertanto, il modificatore "monoclonale" indica che l'anticorpo non è una miscela di anticorpi distinti. Ad esempio, gli anticorpi monoclonali possono essere prodotti con il metodo dell'ibridoma descritto per la prima volta da Kohler *et al.*, *Nature*,

256:495 (1975), oppure possono essere realizzati con metodi a DNA ricombinante (Brevetto U.S. n. 4,816,567).

Nel metodo dell'ibridoma, un topo o un altro animale ospite appropriato, come un criceto, viene immunizzato come descritto in precedenza per suscitare linfociti che producono o sono in grado di produrre anticorpi che legano specificamente la proteina utilizzata per l'immunizzazione. In alternativa, i linfociti possono essere immunizzati in vitro. I linfociti vengono quindi fusi con le cellule di mieloma utilizzando un agente di fusione adatto, come il polietilenglicole, per formare una cellula di ibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pagg. 59-103 (Academic Press, 1986).

L'agente immunizzante includerà tipicamente la proteina antigenica o una sua variante di fusione. In genere si utilizzano linfociti del sangue periferico ("PBL"), se si desiderano cellule di origine umana, oppure cellule della milza o dei linfonodi, se si desiderano fonti di mammiferi non umani. I linfociti vengono quindi fusi con una linea cellulare immortalizzata utilizzando un agente di fusione adatto, come il polietilenglicole, per formare un ibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pagg. 59-103.

Le linee cellulari immortalate sono solitamente cellule trasformate di mammifero, in particolare cellule di mieloma di origine roditrice, bovina e umana. Di solito si utilizzano linee cellulari di mieloma di ratto o di topo. Le cellule di ibridoma così preparate sono seminate e coltivate in un terreno di coltura adatto che contiene preferibilmente una o più sostanze che inibiscono la crescita o la sopravvivenza delle cellule non fuse del mieloma parentale. Ad esempio, se le cellule di mieloma parentali mancano dell'enzima ipoxantina guanina fosforibosil transferasi (HGPRT o HPRT), il terreno di coltura per gli ibridomi includerà in genere ipoxantina, amminopterina e timidina (terreno HAT), sostanze che impediscono la crescita delle cellule con deficit di HGPRT.

Le cellule immortalizzate di mieloma preferite sono quelle che si fondono in modo efficiente, supportano una produzione stabile di anticorpi ad alto livello da parte delle cellule produttrici di anticorpi selezionate e sono sensibili a un mezzo come il mezzo HAT. Tra queste, sono preferite le linee di mieloma murino, come quelle derivate da tumori di topo MOPC-21 e MPC-11, disponibili presso il Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA, e le cellule SP-2 (e loro derivati, *ad esempio* X63-Ag8-653) disponibili presso l'American Type Culture Collection, Manassas, Va. USA. Sono state descritte anche linee cellulari di mieloma umano e di eteromieloma topo-umano per la produzione di anticorpi monoclonali umani (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pagg. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Il terreno di coltura in cui crescono le cellule di ibridoma viene analizzato per la produzione di anticorpi monoclonali diretti contro l'antigene. Preferibilmente, la specificità di legame degli anticorpi monoclonali prodotti da cellule di ibridoma viene determinata mediante immunoprecipitazione

o mediante un saggio di legame in vitro, come il saggio radioimmunoassistito (RIA) o il saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA).

Il terreno di coltura in cui sono coltivate le cellule di ibridoma può essere analizzato per verificare la presenza di anticorpi monoclonali diretti contro l'antigene desiderato. Preferibilmente, l'affinità di legame e la specificità dell'anticorpo monoclonale possono essere determinate mediante immunoprecipitazione o mediante un saggio di legame in vitro, come un saggio radioimmunologico (RIA) o un saggio enzimatico (ELISA). Tali tecniche e saggi sono noti nella tecnica. Ad esempio, l'affinità di legame può essere determinata mediante l'analisi Scatchard di Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Dopo aver identificato le cellule di ibridoma che producono anticorpi della specificità, affinità e/o attività desiderate, i cloni possono essere subclonati mediante procedure di diluizione limitante e coltivati con metodi standard (Goding, sopra). I terreni di coltura adatti a questo scopo includono, ad esempio, D-MEM o RPMI-1640. Inoltre, le cellule dell'ibridoma possono essere coltivate in vivo come tumori in un mammifero.

Gli anticorpi monoclonali secreti dai sottocloni sono opportunamente separati dal terreno di coltura, dal liquido ascitico o dal siero mediante procedure convenzionali di purificazione delle immunoglobuline come, ad esempio, la proteina A-Sepharose, la cromatografia con idrossiapatite, l'elettroforesi su gel, la dialisi o la cromatografia di affinità.

Gli anticorpi monoclonali possono essere prodotti anche con metodi a DNA ricombinante, come quelli descritti nel Brevetto U.S. n. 4,816,567, e come descritto in precedenza. Il DNA che codifica gli anticorpi monoclonali è facilmente isolabile e sequenziabile con procedure convenzionali (*ad esempio*, utilizzando sonde oligonucleotidiche in grado di legarsi specificamente ai geni che codificano le catene pesanti e leggere degli anticorpi murini). Le cellule di ibridoma costituiscono una fonte privilegiata di tale DNA. Una volta isolato, il DNA può essere inserito in vettori di espressione, che vengono poi trasfettati in cellule ospiti come cellule di *E. coli*, cellule di simulazione COS, cellule di ovaio di criceto cinese (CHO) o cellule di mieloma che non producono altrimenti proteine immunoglobuliniche, al fine di sintetizzare anticorpi monoclonali in tali cellule ospiti ricombinanti.

Tra gli articoli di revisione sull'espressione ricombinante in batteri del DNA che codifica l'anticorpo si possono citare Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) e Plickthun, *ImmunoL Revs.* 130:151-188 (1992).

Gli anticorpi possono essere isolati da librerie fagiche di anticorpi generate con le tecniche descritte in McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol Biol.*, 222:581-597 (1991) descrivono l'isolamento di anticorpi murini e umani, rispettivamente, utilizzando librerie di fagi. Pubblicazioni successive descrivono la produzione di anticorpi umani ad alta affinità (gamma nM) mediante rimescolamento delle catene (Marks *et al.*, *BioTechnology*, 10:779-783 (1992)), nonché l'infezione combinatoria e la ricombinazione in vivo come strategia per la costruzione di librerie di fagi molto grandi (Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Pertanto, queste

tecniche sono valide alternative alle tradizionali tecniche di ibridazione di anticorpi monoclonali per l'isolamento di anticorpi monoclonali.

Il DNA può anche essere modificato, ad esempio sostituendo la sequenza codificante per i domini costanti della catena pesante e leggera umana con le sequenze omologhe murine (Brevetto U.S. n. 4,816,567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o unendo covalentemente alla sequenza codificante dell'immunoglobulina tutta o parte della sequenza codificante di un polipeptide non immunoglobulinico. In genere questi polipeptidi non-immunoglobulinici vengono sostituiti ai domini costanti di un anticorpo, oppure vengono sostituiti ai domini variabili di un sito di combinazione dell'antigene di un anticorpo per creare un anticorpo chimerico bivalente che comprende un sito di combinazione dell'antigene con specificità per un antigene e un altro sito di combinazione dell'antigene con specificità per un antigene diverso.

Gli anticorpi monoclonali qui descritti possono essere monovalenti, la cui preparazione è ben nota nella tecnica. Ad esempio, un metodo prevede l'espressione ricombinante della catena leggera dell'immunoglobulina e di una catena pesante modificata. La catena pesante è troncata generalmente in qualsiasi punto della regione Fc, in modo da impedire la reticolazione della catena pesante. In alternativa, i relativi residui di cisteina possono essere sostituiti con un altro residuo amminoacidico o essere eliminati in modo da impedire la reticolazione. I metodi in vitro sono adatti anche alla preparazione di anticorpi monovalenti. La digestione degli anticorpi per produrre i loro frammenti, in particolare i frammenti Fab, può essere effettuata con tecniche di routine note nella tecnica.

Gli anticorpi chimerici o ibridi possono anche essere preparati in vitro utilizzando metodi noti nella chimica delle proteine sintetiche, compresi quelli che prevedono l'uso di agenti reticolanti. Ad esempio, le immunotossine possono essere costruite con una reazione di scambio di disolfuri o con la formazione di un legame tioetere. Esempi di reagenti adatti a questo scopo sono l'imminotiolato e il metil-4-mercaptobutrimidato.

3. Produzione ricombinante in Cellule Procariotiche

a) Costruzione del Vettore

Le sequenze di acido polinucleico che codificano gli anticorpi compresi nel CAR dell'invenzione possono essere ottenute con tecniche ricombinanti standard. Le sequenze di acido polinucleico desiderate possono essere isolate e sequenziate da cellule che producono anticorpi, come le cellule di ibridoma. In alternativa, i polinucleotidi possono essere sintetizzati con tecniche di sintesi nucleotidica o PCR. Una volta ottenute, le sequenze che codificano i polipeptidi vengono inserite in un vettore ricombinante in grado di replicare ed esprimere polinucleotidi eterologhi in ospiti procarioti. Molti vettori disponibili e noti nella tecnica possono essere utilizzati ai fini della presente invenzione. La selezione di un vettore appropriato dipenderà principalmente dalle dimensioni degli acidi nucleici da inserire nel vettore e dalla particolare cellula ospite da trasformare con il vettore. Ogni vettore contiene diversi componenti, a seconda della sua funzione (amplificazione o espressione di un polinucleotide eterologo, o entrambe) e della sua

compatibilità con la particolare cellula ospite in cui risiede. I componenti del vettore includono generalmente, ma non solo: un'origine di replicazione, un gene marcatore di selezione, un promotore, un sito di legame con il ribosoma (RBS), una sequenza di segnale, l'insero di acido nucleico eterologo e una sequenza di terminazione della trascrizione.

In generale, per questi ospiti si utilizzano vettori plasmidici contenenti repliconi e sequenze di controllo derivati da specie compatibili con la cellula ospite. Il vettore reca normalmente un sito di replicazione e sequenze di marcatura in grado di fornire una selezione fenotipica nelle cellule trasformate. Ad esempio, l'*E. coli* viene tipicamente trasformata utilizzando pBR322, un plasmide derivato da una specie di *E. coli*. pBR322 contiene geni che codificano la resistenza all'ampicillina (Amp) e alla tetraciclina (Tet) e fornisce quindi un facile mezzo per identificare le cellule trasformate. pBR322, i suoi derivati, o altri plasmidi microbici o batteriofagi possono anche contenere, o essere modificati per contenere, promotori che possono essere utilizzati dall'organismo microbico per l'espressione di proteine endogene. Esempi di derivati di pBR322 utilizzati per l'espressione di particolari anticorpi sono descritti in dettaglio in Carter *et al.*, Brevetto U.S. n. 5,648,237.

Inoltre, i vettori fagici contenenti repliconi e sequenze di controllo compatibili con il microrganismo ospite possono essere utilizzati come vettori di trasformazione in relazione a questi ospiti. Ad esempio, un batteriofago come GEMTM-11 può essere utilizzato per creare un vettore ricombinante che può essere usato per trasformare cellule ospiti sensibili come *E. coli* LE392.

Il vettore di espressione può comprendere due o più coppie di promotori, che codificano ciascuno dei componenti polipeptidici. Un promotore è una sequenza regolatoria non tradotta localizzata a monte (5') di un cistrone che ne modula l'espressione. I promotori procariotici si dividono tipicamente in due classi, inducibili e costitutivi. Il promotore inducibile è un promotore che avvia un aumento dei livelli di trascrizione del cistrone sotto il suo controllo in risposta a cambiamenti nelle condizioni di coltura, *ad esempio* la presenza o l'assenza di un nutriente o una variazione della temperatura. È noto un gran numero di promotori riconosciuti da una varietà di potenziali cellule ospiti. Il promotore selezionato può essere collegato operativamente al DNA del cistrone che codifica la catena leggera o pesante rimuovendo il promotore dal DNA di partenza mediante digestione con enzimi di restrizione e inserendo la sequenza di promotore isolata nel vettore. Sia la sequenza del promotore nativo che molti promotori eterologhi possono essere utilizzati per dirigere l'amplificazione e/o l'espressione dei geni target. Possono essere utilizzati promotori eterologhi, che in genere consentono una maggiore trascrizione e una maggiore produzione di gene target espresso rispetto al promotore del polipeptide target nativo.

I promotori adatti all'uso con ospiti procariotici includono il promotore PhoA, i sistemi di promotori della galattamasi e del lattosio, un sistema di promotori del triptofano (*trp*) e promotori ibridi come il promotore *tac* o il promotore *trc*. Tuttavia, sono adatti anche altri promotori funzionali nei batteri (come altri promotori batterici o fagici noti). Le loro sequenze di acido nucleico sono state pubblicate, consentendo così a un operatore esperto

di legarle a cistroni che codificano le catene leggere e pesanti target (Siebenlist *et al.* (1980) *Cell* 20: 269) utilizzando linker o adattatori per fornire i siti di restrizione necessari.

In un aspetto, ciascun cistrone all'interno del vettore ricombinante comprende una sequenza di segnale di secrezione che dirige la traslocazione dei polipeptidi espressi attraverso una membrana. In generale, la sequenza segnale può essere un componente del vettore o una parte del DNA del polipeptide target inserito nel vettore. La sequenza segnale selezionata ai fini della presente invenzione deve essere riconosciuta e processata (*vale a dire* clivata da una peptidasi segnale) dalla cellula ospite. Per le cellule ospiti procariotiche che non riconoscono e processano le sequenze segnale native dei polipeptidi eterologhi, la sequenza segnale è sostituita da una sequenza segnale procariotica selezionata, ad esempio, dal gruppo costituito dai leader della fosfatasi alcalina, della penicillinasi, dell'Ipp o dell'enterotossina II (STII) stabile al calore, LamB, PhoE, PelB, OmpA e MBP. Le sequenze segnale utilizzate in entrambi i cistroni del sistema di espressione possono essere sequenze segnale STII o loro varianti.

La produzione di anticorpi può avvenire nel citoplasma della cellula ospite e quindi non richiede la presenza di sequenze di segnale di secrezione all'interno di ciascun cistrone. I componenti polipeptidici, come il polipeptide che codifica il dominio V_H della prima porzione legante l'antigene, facoltativamente fuso con la seconda porzione legante l'antigene, e il polipeptide che codifica il dominio V_L della prima porzione legante l'antigene, facoltativamente fuso con la seconda porzione legante l'antigene, possono essere espressi, ripiegati e assemblati per formare anticorpi funzionali nel citoplasma. Alcuni ceppi ospiti (*ad esempio*, i ceppi *E. coli* trxB⁻) offrono condizioni del citoplasma favorevoli alla formazione di legami disolfuro, consentendo così un corretto ripiegamento e assemblaggio delle subunità proteiche espresse. Proba e Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

Viene presentato un sistema di espressione in cui il rapporto quantitativo dei componenti polipeptidici espressi può essere modulato al fine di massimizzare la resa di anticorpi secreti e correttamente assemblati. Tale modulazione è ottenuta, almeno in parte, modulando contemporaneamente le forze traslazionali dei componenti polipeptidici. Una tecnica per modulare la forza traslazionale è descritta in Simmons *et al.*, Brevetto U.S. n. 5,840,523. Utilizza varianti della regione di iniziazione traslazionale (TIR) all'interno di un cistrone. Per un determinato TIR, è possibile creare una serie di varianti di sequenze di amminoacidi o di acidi nucleici con una gamma di forze traslazionali, fornendo così un mezzo conveniente per regolare questo fattore per il livello di espressione desiderato della catena specifica. Le varianti TIR possono essere generate mediante tecniche di mutagenesi convenzionali che comportano cambiamenti di codone che possono alterare la sequenza di amminoacidi, anche se sono preferibili cambiamenti silenziosi nella sequenza di acido nucleico. Le alterazioni del TIR possono comprendere, ad esempio, alterazioni del numero o della spaziatura delle sequenze Shine-Dalgarno, oltre ad alterazioni della sequenza del segnale. Un metodo per generare sequenze di segnale mutanti è la generazione di un "banco di codoni" all'inizio di una sequenza codificante che non modifica la sequenza amminoacidica della sequenza di segnale (*vale a dire* che i

cambiamenti sono silenziosi). Inoltre, alcuni amminoacidi, come la leucina, la serina e l'arginina, hanno posizioni multiple in prima e seconda posizione che possono aggiungere complessità nella realizzazione del banco. Questo metodo di mutagenesi è descritto in dettaglio in Yansura *et al.* (1992) *METHODS: Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

Preferibilmente, viene generato un insieme di vettori con una gamma di intensità TIR per ciascun cistrone in essi contenuto. Questo set limitato consente di confrontare i livelli di espressione di ciascuna catena e la resa dei prodotti proteici desiderati con varie combinazioni di forza TIR. La forza dei TIR può essere determinata quantificando il livello di espressione di un gene reporter, come descritto in dettaglio in Simmons *et al.* Brevetto U.S. n. 5,840,523. In base al confronto della forza traslazionale, i singoli TIR desiderati vengono selezionati per essere combinati nei costrutti dei vettori di espressione.

b) Cellule Ospiti Procariotiche.

Le cellule ospiti procariotiche adatte all'espressione degli anticorpi includono gli Archaeobacteria e gli Eubacteria, come gli organismi Gram-negativi o Gram-positivi. Esempi di batteri utili sono *Escherichia* (ad esempio, *E. coli*), *Bacilli* (ad esempio, *B. subtilis*), Enterobatteri, specie di *Pseudomonas* (ad esempio, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. In alcune forme di realizzazione si utilizzano cellule gram-negative. In un esempio vengono utilizzate cellule di *E. coli* come ospiti. Esempi di ceppi di *E. coli* includono il ceppo W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pagg. 1190-1219; Deposito ATCC n. 27,325) e suoi derivati, compreso il ceppo 33D3 con genotipo W3110 AfhuA (AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-fepE) degP41 kan^R (Brevetto U.S. n. 5,639,635). Sono adatti anche altri ceppi e loro derivati, come *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) ed *E. coli* RV308 (ATCC 31.608). Questi esempi sono illustrativi e non limitativi. I metodi per la costruzione di derivati di uno qualsiasi dei batteri sopra citati con genotipi definiti sono noti nella tecnica e descritti, ad esempio, in, Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990). In genere è necessario selezionare i batteri appropriati tenendo conto della replicabilità del replicone nelle cellule di un batterio. Ad esempio, le specie *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* possono essere adeguatamente utilizzate come ospite quando plasmidi ben noti come pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 sono utilizzati per fornire il replicone.

In genere la cellula ospite dovrebbe secernere quantità minime di enzimi proteolitici e nella coltura cellulare possono essere auspicabilmente incorporati ulteriori inibitori delle proteasi.

c) Produzione di Proteine

Le cellule ospiti vengono trasformate con i vettori di espressione sopra descritti e coltivate in terreni nutritivi convenzionali modificati in modo

appropriato per indurre i promotori, selezionare i trasformanti o amplificare i geni che codificano le sequenze desiderate. Per trasformazione si intende l'introduzione di DNA nell'ospite procariotico in modo che il DNA sia replicabile, sia come elemento extracromosomico che come integratore cromosomico. A seconda della cellula ospite utilizzata, la trasformazione viene effettuata utilizzando le tecniche standard appropriate per tali cellule. Il trattamento con cloruro di calcio è generalmente utilizzato per le cellule batteriche che contengono una sostanziale barriera cellulare. Un altro metodo di trasformazione utilizza il polietilenglicole/DMSO. Un'altra tecnica utilizzata è l'elettroporazione.

Le cellule procariotiche utilizzate per produrre gli anticorpi sono coltivate in terreni noti nella tecnica e adatti alla coltura delle cellule ospiti selezionate. Esempi di terreni adatti sono il brodo di Luria (LB) e i necessari supplementi di nutrienti. In alcuni esempi, il terreno contiene anche un agente di selezione, scelto in base alla costruzione del vettore di espressione, per consentire selettivamente la crescita di cellule procariotiche contenenti il vettore di espressione. Ad esempio, l'ampicillina viene aggiunta ai terreni di coltura per la crescita di cellule che esprimono un gene resistente all'ampicillina.

Oltre alle fonti di carbonio, azoto e fosfato inorganico, è possibile includere qualsiasi integratore necessario, a concentrazioni adeguate, introdotto da solo o in miscela con un altro integratore o terreno di coltura, come ad esempio una fonte di azoto complesso. Facoltativamente, il terreno di coltura può contenere uno o più agenti riducenti selezionati dal gruppo costituito da glutazione, cisteina, cistamina, tioglicolato, ditioeritritolo e ditiotreitolo. Le cellule ospiti procariotiche vengono coltivate a temperature adeguate. Per la crescita di *E. coli*, ad esempio, la temperatura preferita va da circa 20°C a circa 39°C, più preferibilmente da circa 25°C a circa 37°C, ancora più preferibilmente a circa 30°C. Il pH del terreno di coltura può essere qualsiasi, da circa 5 a circa 9, a seconda dell'organismo ospite. Per l'*E. coli*, il pH è preferibilmente compreso tra circa 6,8 e circa 7,4, e più preferibilmente circa 7,0.

Se nel vettore di espressione viene utilizzato un promotore inducibile, l'espressione della proteina viene indotta in condizioni adatte all'attivazione del promotore. In un aspetto, i promotori PhoA sono utilizzati per controllare la trascrizione dei polipeptidi. Di conseguenza, le cellule ospiti trasformate vengono coltivate in un terreno a limitazione di fosfati per l'induzione. Preferibilmente, il terreno di coltura a limitazione di fosfati è il terreno di coltura C.R.A.P (vedere, *ad esempio*, Simmons *et al.*, *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). A seconda del costrutto vettoriale impiegato, è possibile utilizzare una serie di altri induttori, come è noto nella tecnica.

Gli anticorpi espressi vengono secreti e recuperati dal periplasma delle cellule ospiti. Il recupero delle proteine comporta tipicamente la disgregazione del microorganismo, in genere mediante shock osmotico, sonicazione o lisi. Una volta disgregate le cellule, i detriti cellulari o le cellule intere possono essere rimossi mediante centrifugazione o filtrazione. Le proteine possono essere ulteriormente purificate, ad esempio, mediante cromatografia con

resina di affinità. In alternativa, le proteine possono essere trasportate nel terreno di coltura e isolate. Le cellule possono essere rimosse dalla coltura e il surnatante della coltura può essere filtrato e concentrato per un'ulteriore purificazione delle proteine prodotte. I polipeptidi espressi possono essere ulteriormente isolati e identificati con metodi comunemente noti, come l'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) e il saggio Western blot.

In alternativa, la produzione di proteine in grandi quantità avviene tramite un processo di fermentazione. Per la produzione di proteine ricombinanti sono disponibili diverse procedure di fermentazione fed-batch su larga scala. Le fermentazioni su larga scala hanno una capacità di almeno 1.000 litri, preferibilmente da 1.000 a 100.000 litri. Questi fermentatori utilizzano giranti agitatrici per distribuire ossigeno e sostanze nutritive, in particolare il glucosio (la fonte di carbonio/energia preferita). La fermentazione su piccola scala si riferisce generalmente alla fermentazione in un fermentatore di capacità volumetrica non superiore a circa 100 litri e può variare da circa 1 litro a circa 100 litri.

Durante il processo di fermentazione, l'induzione dell'espressione proteica viene tipicamente avviata dopo che le cellule sono cresciute in condizioni adeguate fino a raggiungere la densità desiderata, *ad esempio* una OD₅₅₀ di circa 180-220, fase in cui le cellule si trovano nella fase stazionaria iniziale. A seconda del costrutto vettoriale impiegato, si possono utilizzare diversi induttori, come è noto nella tecnica e descritto in precedenza. Le cellule possono essere coltivate per periodi più brevi prima dell'induzione. Le cellule vengono solitamente indotte per circa 12-50 ore, anche se è possibile utilizzare tempi di induzione più o meno lunghi.

Per migliorare la resa produttiva e la qualità degli anticorpi, è possibile modificare diverse condizioni di fermentazione. Per esempio, per migliorare il corretto assemblaggio e ripiegamento dei polipeptidi secreti, si possono usare vettori aggiuntivi che sovraesprimono proteine chaperone, come le proteine Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD e o DsbG) o FkpA (una peptidilproliasi cis,trans-isomerasi con attività chaperone) per co-trasformare le cellule procariotiche ospiti. È stato dimostrato che le proteine chaperone facilitano il corretto ripiegamento e la solubilità di proteine eterologhe prodotte in cellule ospiti batteriche. Chen *et al.* (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou *et al.*, Brevetto U.S. n. 6,083,715; Georgiou *et al.*, Brevetto U.S. n. 6,027,888; Bothmann e Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm e Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie *et al.* (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Per ridurre al minimo la proteolisi delle proteine eterologhe espresse (soprattutto quelle sensibili alla proteolisi), per la presente invenzione si possono utilizzare alcuni ceppi ospiti carenti di enzimi proteolitici. Ad esempio, i ceppi di cellule ospiti possono essere modificati per effettuare mutazioni genetiche nei geni che codificano le proteasi batteriche note, come la proteasi III, OmpT, DegP, Tsp, la proteasi I, la proteasi Mi, la proteasi V, la proteasi VI e loro combinazioni. Alcuni ceppi di *E. coli* proteasi-deficienti sono disponibili e descritti, ad esempio, in Joly *et al.* (1998), sopra; Georgiou *et al.*, Brevetto U.S. n. 5,264,365; Georgiou *et al.*, Brevetto U.S. n. 5,508,192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72

(1996).

Ceppi di *E. coli* carenti di enzimi proteolitici e trasformati con plasmidi che sovraesprimono una o più proteine chaperone possono essere utilizzati come cellule ospiti nel sistema di espressione che codifica gli anticorpi.

d) Purificazione delle Proteine

Gli anticorpi qui prodotti vengono ulteriormente purificati per ottenere preparazioni sostanzialmente omogenee per ulteriori saggi e utilizzi. Si possono utilizzare i metodi standard di purificazione delle proteine noti nella tecnica. Le seguenti procedure sono procedure di purificazione esemplificative adatte: frazionamento su colonne di immunoaffinità o a scambio ionico, precipitazione con etanolo, HPLC in fase inversa, cromatografia su silice o su una resina a scambio cationico come la DEAE, cromatofocalizzazione, SDS-PAGE, precipitazione con solfato di ammonio e filtrazione su gel utilizzando, ad esempio, Sephadex G-75.

In un aspetto, la proteina A immobilizzata su una fase solida viene utilizzata per la purificazione per immunoaffinità degli anticorpi che comprendono una regione Fc. La proteina A è una proteina della parete cellulare di 41kD dello *Staphylococcus aureus* che si lega con un'elevata affinità alla regione Fc degli anticorpi. Lindmark *et al* (1983) *J. Immunol. Met.* 62: 1-13. La fase solida su cui è immobilizzata la proteina A è preferibilmente una colonna con una superficie di vetro o di silice, più preferibilmente una colonna di vetro a pori controllati o una colonna di acido silicico. In alcune applicazioni, la colonna è stata rivestita con un reagente, come il glicerolo, nel tentativo di prevenire l'adesione non specifica di contaminanti. La fase solida viene quindi lavata per rimuovere i contaminanti legati in modo non specifico alla fase solida. Infine, gli anticorpi di interesse vengono recuperati dalla fase solida mediante eluizione.

4. Produzione di Ricombinanti in Cellule Eucariotiche

Per l'espressione eucariotica, i componenti del vettore includono generalmente, ma non solo, uno o più dei seguenti elementi: una sequenza segnale, un'origine di replicazione, uno o più geni marcatori, un elemento potenziatore, un promotore e una sequenza di terminazione della trascrizione.

a) Componente della Sequenza del Segnale

Un vettore da utilizzare in un ospite eucariotico può anche avere un inserto che codifica una sequenza segnale o un altro polipeptide con uno specifico sito di clivaggio al terminale N della proteina o del polipeptide maturo. La sequenza segnale eterologa selezionata è preferibilmente quella riconosciuta e processata (*vale a dire* clivata da una peptidasi segnale) dalla cellula ospite. Per l'espressione in cellule di mammifero, sono disponibili sequenze di segnale di mammifero e leader secretori virali, ad esempio il segnale gD dell'herpes simplex.

Il DNA di tale regione precursore è legato in lettura al DNA che codifica gli anticorpi.

b) Origine della Replicazione

In genere, la componente dell'origine di replicazione non è necessaria per i vettori di espressione dei mammiferi (l'origine SV40 può essere utilizzata solo perché contiene il promotore precoce).

c) Componente Genica di Selezione

I vettori di espressione e clonazione possono contenere un gene di selezione, detto anche marcatore selezionabile. I tipici geni di selezione codificano proteine che (a) conferiscono resistenza agli antibiotici o ad altre tossine, *ad esempio* ampicillina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) completano le carenze auxotrofiche o (c) forniscono nutrienti critici non disponibili nei terreni complessi, *ad esempio* il gene che codifica la D-alanina racemasi per i bacilli.

Un esempio di schema di selezione utilizza un farmaco per arrestare la crescita di una cellula ospite. Le cellule trasformate con successo con un gene eterologo producono una proteina che conferisce resistenza ai farmaci e quindi sopravvivono al regime di selezione. Esempi di tale selezione dominante sono i farmaci neomicina, acido micofenolico e igromicina.

Un altro esempio di marcatori selezionabili adatti per le cellule di mammifero sono quelli che consentono di identificare le cellule competenti ad assumere l'acido nucleico che codifica gli anticorpi, come DHFR, timidina chinasi, metallotioneina-I e -II, preferibilmente i geni della metallotioneina dei primati, adenosina deaminasi, ornitina decarbossilasi, eccetera.

Ad esempio, le cellule trasformate con il gene di selezione DHFR vengono prima identificate mettendo in coltura tutti i trasformanti in un terreno di coltura contenente metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo del DHFR. Una cellula ospite appropriata quando si utilizza il DHFR wild-type è la linea cellulare dell'ovaio di criceto cinese (CHO) carente di attività DHFR (*ad esempio*, ATCC CRL-9096).

In alternativa, le cellule ospiti (in particolare quelle wild-type che contengono DHFR endogeno) trasformate o co-trasformate con le sequenze di DNA polipeptidico codificante, la proteina DHFR wild-type e un altro marcatore selezionabile, come l'aminoglicoside 3'-fosfotransferasi (APH), possono essere selezionate mediante crescita cellulare in un terreno contenente un agente di selezione per il marcatore selezionabile, come un antibiotico aminoglicosidico, *ad esempio* kanamicina, neomicina o G418. Vedere il Brevetto U.S. n. 4,965,199.

d) Componente Promotore

I vettori di espressione e clonazione contengono solitamente un promotore riconosciuto dall'organismo ospite e collegato operativamente all'acido nucleico che codifica le sequenze polipeptidiche desiderate. Praticamente tutti i geni eucariotici hanno una regione ricca di AT localizzata a circa 25-30 basi a monte del sito di inizio della trascrizione. Un'altra sequenza che si trova da 70 a 80 basi a monte dell'inizio della trascrizione di molti geni

è una regione CNCAAT dove N può essere un qualsiasi nucleotide. All'estremità 3' della maggior parte degli eucarioti si trova una sequenza AATAAA che può essere il segnale per l'aggiunta della coda di poli A all'estremità 3' della sequenza codificante. Tutte queste sequenze possono essere inserite in vettori di espressione eucariotici.

Altri promotori adatti all'uso con ospiti procariotici includono il promotore *phoA*, i sistemi di promotori della lattamasi e del lattosio, il promotore della fosfatasi alcalina, un sistema di promotori del triptofano (*trp*) e promotori ibridi come il promotore *tac*. Tuttavia, altri promotori batterici noti sono adatti. I promotori da utilizzare nei sistemi batterici conterranno anche una sequenza Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente legata al DNA che codifica gli anticorpi.

La trascrizione di polipeptidi da vettori in cellule ospiti di mammifero è controllata, ad esempio, da promotori ottenuti da genomi di virus come il virus del pollioma, il virus del vaiolo, l'adenovirus (come l'Adenovirus 2), il papilloma virus bovino, il virus del sarcoma aviario, il citomegalovirus, un retrovirus, il virus dell'epatite-B e, preferibilmente, il Simian Virus 40 (SV40), da promotori eterologhi di mammiferi, *ad esempio*, il promotore dell'actina o un promotore delle immunoglobuline, da promotori di shock termico, a condizione che tali promotori siano compatibili con i sistemi cellulari ospiti.

I promotori precoci e tardivi del virus SV40 sono opportunamente ottenuti come frammento di restrizione SV40 che contiene anche l'origine di replicazione virale SV40. Il promotore immediato precoce del citomegalovirus umano si può ottenere comodamente come frammento di restrizione HindIII E. Un sistema per l'espressione di DNA nei mammiferi che utilizza il papilloma virus bovino come vettore è descritto nel Brevetto U.S. n. 4,419,446. Una modifica di questo sistema è descritta nel Brevetto U.S. n. 4,601,978. Vedere anche Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) sull'espressione del cDNA dell'interferone umano in cellule di topo sotto il controllo di un promotore della timidina chinasi del virus herpes simplex. In alternativa, è possibile utilizzare come promotore la ripetizione terminale lunga del virus del sarcoma di Rous.

e) Componente Elemento Enhancer

La trascrizione di un DNA che codifica gli anticorpi da parte degli eucarioti superiori viene spesso aumentata inserendo una sequenza enhancer nel vettore. Sono ormai note molte sequenze di enhancer di geni di mammifero (globina, elastasi, albumina, α -fetoproteina e insulina). In genere, tuttavia, si utilizza un enhancer proveniente da un virus di una cellula eucariotica. Esempi sono l'enhancer di SV40 sul lato tardivo dell'origine di replicazione (bp 100-270), l'enhancer del promotore precoce di citomegalovirus, l'enhancer di pollioma sul lato tardivo dell'origine di replicazione e gli enhancer di adenovirus. Vedere anche Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sugli elementi potenzianti per l'attivazione dei promotori eucariotici. L'enhancer può essere inserito nel vettore in una posizione 5' o 3' rispetto alla sequenza del polipeptide codificante, ma è preferibilmente localizzato in un sito 5'

rispetto al promotore.

f) Componente di Terminazione della Trascrizione

I vettori di espressione utilizzati in cellule ospiti eucariotiche (lievito, funghi, insetti, piante, animali, esseri umani o cellule nucleate di altri organismi multicellulari) contengono anche sequenze necessarie per la terminazione della trascrizione e per la stabilizzazione dell'mRNA. Tali sequenze sono comunemente disponibili nelle regioni 5' e, occasionalmente 3', non tradotte di DNA o cDNA eucariotici o virali. Queste regioni contengono segmenti nucleotidici trascritti come frammenti poliadenilati nella porzione non tradotta dell'mRNA codificante il polipeptide. Un utile componente di terminazione della trascrizione è la regione di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino. Vedere WO94/11026 e il vettore di espressione ivi descritto.

g) Selezione e Trasformazione di Cellule Ospiti

Le cellule ospiti adatte per il clonaggio o l'espressione del DNA nei vettori qui descritti includono le cellule di eucarioti superiori qui descritte, comprese le cellule ospiti di vertebrati. La propagazione di cellule di vertebrati in coltura (coltura di tessuti) è diventata una procedura di routine. Esempi di linee cellulari ospiti utili per i mammiferi sono la linea CV1 di rene di scimmia trasformata da SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la linea di rene embrionale umano (293 o cellule 293 subclonate per la crescita in coltura in sospensione, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); cellule di rene di criceto (BHK, ATCC CCL 10); cellule di ovaio di criceto cinese/DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); cellule del sertoli di topo (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); cellule renali di scimmia (CV1 ATCC CCL 70); cellule renali di scimmia verde africana (VERO-76, ATCC CRL-1587); cellule di carcinoma cervicale umano (HELA, ATCC CCL 2); cellule renali canine (MDCK, ATCC CCL 34); cellule epatiche di ratto bufalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); cellule polmonari umane (W138, ATCC CCL 75); cellule epatiche umane (Hep G2, HB 8065); tumore mammario di topo (MMT 060562, ATCC CCL51); cellule TR1 (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); cellule MRC 5; cellule FS4 e una linea di epatoma umano (Hep G2).

Le cellule ospiti vengono trasformate con i vettori di espressione o di clonazione sopra descritti per la produzione di anticorpi e coltivate in terreni nutritivi convenzionali modificati in modo appropriato per indurre i promotori, selezionare i trasformanti o amplificare i geni che codificano le sequenze desiderate.

h) Coltura delle Cellule Ospiti

Le cellule ospiti utilizzate per produrre gli anticorpi possono essere coltivate in diversi terreni. I terreni disponibili in commercio, come Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) e Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) sono adatti

alla coltura delle cellule ospiti. Inoltre, qualsiasi mezzo descritto in Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), nei Brevetti U.S. n. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o nel Brevetto U.S. Re. 30,985 può essere utilizzato come terreno di coltura per le cellule ospiti. Ognuno di questi terreni può essere integrato, se necessario, con ormoni e/o altri fattori di crescita (come insulina, transferrina o fattore di crescita epidermico), sali (come cloruro di sodio, calcio, magnesio e fosfato), tamponi (come HEPES), nucleotidi (come adenosina e timidina), antibiotici (come il farmaco GENTAMYCIN™), oligoelementi (definiti come composti inorganici solitamente presenti a concentrazioni finali nell'intervallo micromolare) e glucosio o una fonte energetica equivalente. Possono essere inclusi anche altri integratori necessari, in concentrazioni adeguate e note agli esperti del settore. Le condizioni di coltura, come temperatura, pH e simili, sono quelle precedentemente utilizzate con la cellula ospite selezionata per l'espressione e saranno evidenti agli esperti della tecnica.

i) Purificazione delle Proteine

Quando si utilizzano tecniche ricombinanti, gli anticorpi possono essere prodotti a livello intracellulare, nello spazio periplasmatico o direttamente secreti nel terreno di coltura. Se l'anticorpo è prodotto a livello intracellulare, come prima fase, i detriti particellari, cellule ospiti o frammenti lisati, vengono rimossi, ad esempio, mediante centrifugazione o ultrafiltrazione. Carter *et al.*, *BioTechnology* 10:163-167 (1992) descrivono una procedura per isolare gli anticorpi secreti nello spazio periplasmatico di *E. coli*. In breve, la pasta cellulare viene scongelata in presenza di acetato di sodio (pH 3,5), EDTA e fenilmetilsolfonilfluoruro (PMSF) per circa 30 minuti. I detriti cellulari possono essere rimossi mediante centrifugazione. Quando l'anticorpo viene secreto nel terreno di coltura, i surnatanti di questi sistemi di espressione vengono generalmente concentrati utilizzando un filtro per la concentrazione delle proteine disponibile in commercio, ad esempio un'unità di ultrafiltrazione Amicon o Millipore Pellicon. In una delle fasi precedenti si può includere un inibitore della proteasi, come il PMSF, per inibire la proteolisi e si possono includere antibiotici per prevenire la crescita di contaminanti avventizi.

La composizione proteica preparata dalle cellule può essere purificata utilizzando, ad esempio, la cromatografia con idrossiapatite, l'elettroforesi su gel, la dialisi e la cromatografia di affinità; la cromatografia di affinità è la tecnica di purificazione preferita. L'idoneità della proteina A come ligando di affinità dipende dalla specie e dall'isotipo del dominio Fc dell'immunoglobulina presente nell'anticorpo. La proteina A può essere utilizzata per purificare gli anticorpi basati su immunoglobuline umane contenenti 1, 2 o 4 catene pesanti (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Met.* 62:1-13 (1983)). La proteina G è raccomandata per tutti gli isotipi di topo e per il 3 umano (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matrice a cui è attaccato il ligando di affinità è spesso l'agarosio, ma sono disponibili altre matrici. Le matrici meccanicamente stabili, come il vetro a pori controllati o il poli(stirene-divinil)benzene, consentono velocità di flusso più elevate e tempi di lavorazione più brevi di quelli ottenibili con l'agarosio. Quando

l'anticorpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) è utile per la purificazione. Altre tecniche per la purificazione delle proteine come il frazionamento su una colonna a scambio ionico, la precipitazione di etanolo, HPLC a fase inversa, cromatografia su silice, cromatografia su eparina SEPHAROSE™ cromatografia su resina a scambio ionico o cationico (come una colonna di acido poliaspartico), cromatofocalizzazione, a seconda dell'anticorpo da recuperare, sono disponibili anche SDS-PAGE e la precipitazione con solfato di ammonio.

Dopo qualsiasi fase di purificazione preliminare, la miscela comprendente l'anticorpo di interesse e i contaminanti può essere sottoposta a cromatografia a interazione idrofobica a basso pH utilizzando un tampone di eluizione a un pH compreso tra circa 2,5-4,5, preferibilmente eseguito a basse concentrazioni di sale (*ad esempio*, da circa 0-0,25 M di sale).

Immunoconiugati (La sezione "Immunoconiugati" è indicata come riferimento. Le forme di realizzazione divulgate in questa sezione non sono forme di realizzazione dell'invenzione)

In alcune forme di realizzazione, esistono anche immunoconiugati che comprendono uno qualsiasi degli anticorpi (come gli anticorpi a dominio singolo) qui descritti coniugati con uno o più agenti citotossici, come agenti chemioterapici o farmaci, agenti inibitori della crescita, tossine (*ad esempio*, tossine proteiche, tossine enzimaticamente attive di origine batterica, fungina, vegetale o animale, o loro frammenti), o isotopi radioattivi.

In alcune forme di realizzazione, un immunoconiugato è un coniugato anticorpo-farmaco (ADC) in cui un anticorpo è coniugato a uno o più farmaci, tra cui, ma non solo, un maytansinoide (*vedere* i Brevetti U.S. n. 5,208,020, 5,416,064 e il Brevetto Europeo EP 0 425 235 B1); un'auristatina come le porzioni di farmaco monometilauristatina DE e DF (MMAE e MMAF) (*vedere* i Brevetti U.S. n. 5,635,483 e 5,780,588, e 7,498,298); una dolastatina; una calicheamicina o un suo derivato (*vedere* i Brevetti U.S. n. 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, e 5,877,296; Hinman *et al.*, *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); e Lode *et al.*, *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); un'antraciclina come la daunomicina o la doxorubicina (*vedere* Kratz *et al.*, *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey *et al.*, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov *et al.*, *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King *et al.*, *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); e il Brevetto US n. 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano come docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tasetaxel e ortataxel; un tricotecene; e CC1065.

In alcune forme di realizzazione, un immunoconiugato comprende un anticorpo, come descritto nel presente documento, coniugato con una tossina enzimaticamente attiva o un suo frammento, inclusi, ma non solo, la catena A della difterite, frammenti attivi non vincolanti della tossina difterica, la catena A dell'esotossina (da *Pseudomonas aeruginosa*), la catena A della ricina, catena A dell'abrina, catena A della modeccina, alfa-sarcina, proteine

dell'*Aleurites fordii*, proteine della diantina, proteine della *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibitore della *momordica charantia*, curcina, crotina, inibitore della *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogellina, restrictocina, fenomicina, enomicina e tricoteceni.

In alcune forme di realizzazione, un immunoconiugato comprende un anticorpo, come descritto nel presente documento, coniugato a un atomo radioattivo per formare un radioconiugato. Per la produzione di radioconiugati sono disponibili diversi isotopi radioattivi. Esempi sono At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isotopi radioattivi di Lu. Quando il radioconiugato viene utilizzato per il rilevamento, può comprendere un atomo radioattivo per studi scintigrafici, ad esempio ^{99m}Tc o I^{123} , o un'etichetta di spin per l'imaging a risonanza magnetica nucleare (NMR) (nota anche come risonanza magnetica, MRI), come ad esempio iodio-123, iodio-131, indio-111, fluoro-19, carbonio-13, azoto-15, ossigeno-17, gadolinio, manganese o ferro.

I coniugati di un anticorpo e di un agente citotossico possono essere realizzati utilizzando una varietà di agenti di accoppiamento proteico bifunzionali come l'*N*-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), il succinimidil-4-(*N*-maleimmidometil) cicloesano-1-carbossilato (SMCC), l'imminotiolano (IT), i derivati bifunzionali degli imidoesteri (come il dimetil adipimidato HCl), esteri attivi (come il disuccinimidil suberato), aldeidi (come la glutaraldeide), composti bis-azotati (come la bis (p-azidobenzoil) esandiammina), derivati del bis-diazonio (come la bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiammina), diisocianati (come il toluene 2,6-diisocianato) e composti fluorurati bis-attivi (come l'1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). Ad esempio, un'immunotossina di ricina può essere preparata come descritto in Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). L'acido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilentriamminopentaacetico (MX-DTPA) marcato con carbonio-14 è un agente chelante esemplificativo per la coniugazione del radionucleotide all'anticorpo. Vedere WO94/11026. Il linker può essere un "linker clivabile" che facilita il rilascio di un farmaco citotossico nella cellula. Ad esempio, un linker acido-labile, un linker sensibile alla peptidasi, un linker fotolabile, un linker dimetilico o un linker contenente disolfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52: 127-131 (1992); Brevetto U.S. n. 5,208,020) può essere utilizzato.

Gli immunoconiugati o ADC qui contemplati contemplano espressamente, ma non sono limitati a, tali coniugati preparati con reagenti cross-linker tra cui, ma non solo, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC e sulfo-SMPB, e SVSB (succinimidil-(4-vinilsolfone)benzoato) che sono disponibili in commercio (*ad esempio*, da Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.).

Metodi e Composizioni per la Diagnostica e il Rilevamento La sezione "Metodi e composizioni per la diagnostica e il rilevamento" è indicata come riferimento. Le forme di realizzazione descritte in questa sezione non sono forme di realizzazione dell'invenzione).

In alcune forme di realizzazione, uno qualsiasi degli anticorpi (come gli anticorpi a dominio singolo) qui forniti è utile per rilevare la presenza

dell'antigene corrispondente (come CD19, CD20, BCMA o CD38) in un campione biologico. Il termine "rilevamento" utilizzato nel presente documento comprende il rilevamento quantitativo o qualitativo. In alcune forme di realizzazione, un campione biologico è costituito da sangue, siero o altri campioni liquidi di origine biologica. In alcune forme di realizzazione, un campione biologico comprende una cellula o un tessuto.

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un anticorpo anti-CD19 (come uno qualsiasi degli anticorpi anti-CD19 a dominio singolo qui descritti) da utilizzare in un metodo di diagnosi o rilevamento. In un altro aspetto, viene fornito un metodo per rilevare la presenza di CD19 in un campione biologico. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende la rilevazione della presenza della proteina CD19 in un campione biologico. In alcune forme di realizzazione, il CD19 è un CD19 umano. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende il contatto del campione biologico con un anticorpo anti-CD19, come descritto nel presente documento, in condizioni che permettano il legame dell'anticorpo anti-CD19 con il CD19 e la rilevazione della formazione di un complesso tra l'anticorpo anti-CD19 e il CD19. Tale metodo può essere un metodo *in vitro* o *in vivo*. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-CD19 viene utilizzato per selezionare i soggetti idonei alla terapia con un anticorpo anti-CD19, *ad esempio* quando il CD19 è un biomarcatore per la selezione dei pazienti.

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un anticorpo anti-CD20 (come uno qualsiasi degli anticorpi anti-CD20 a dominio singolo qui descritti) da utilizzare in un metodo di diagnosi o rilevamento. In un altro aspetto, viene fornito un metodo per rilevare la presenza di CD20 in un campione biologico. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende la rilevazione della presenza della proteina CD20 in un campione biologico. In alcune forme di realizzazione, il CD20 è un CD20 umano. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende il contatto del campione biologico con un anticorpo anti-CD20, come descritto nel presente documento, in condizioni favorevoli al legame dell'anticorpo anti-CD20 con il CD20 e la rilevazione della formazione di un complesso tra l'anticorpo anti-CD20 e il CD20. Tale metodo può essere un metodo *in vitro* o *in vivo*. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-CD20 viene utilizzato per selezionare i soggetti idonei alla terapia con un anticorpo anti-CD20, *ad esempio* quando il CD20 è un biomarcatore per la selezione dei pazienti.

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un anticorpo anti-BCMA (come uno qualsiasi degli anticorpi anti-BCMA a dominio singolo qui descritti) da utilizzare in un metodo di diagnosi o rilevamento. In un altro aspetto, viene fornito un metodo per rilevare la presenza di BCMA in un campione biologico. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende la rilevazione della presenza della proteina BCMA in un campione biologico. In alcune forme di realizzazione, il BCMA è umano. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende il contatto del campione biologico con un anticorpo anti-BCMA, come descritto nel presente documento, in condizioni favorevoli al legame dell'anticorpo anti-BCMA con il BCMA e la rilevazione della formazione di un complesso tra l'anticorpo anti-BCMA e il BCMA. Tale metodo può essere un metodo *in vitro* o *in vivo*.

In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-BCMA viene utilizzato per selezionare i soggetti idonei alla terapia con un anticorpo anti-BCMA, *ad esempio* quando il BCMA è un biomarcatore per la selezione dei pazienti.

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un anticorpo anti-CD38 (come uno qualsiasi degli anticorpi anti-CD38 a dominio singolo qui descritti) da utilizzare in un metodo di diagnosi o rilevamento. In un altro aspetto, viene fornito un metodo per rilevare la presenza di CD38 in un campione biologico. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende la rilevazione della presenza della proteina CD38 in un campione biologico. In alcune forme di realizzazione, il CD38 è un CD38 umano. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende il contatto del campione biologico con un anticorpo anti-CD38, come descritto nel presente documento, in condizioni favorevoli al legame dell'anticorpo anti-CD38 con il CD38 e la rilevazione della formazione di un complesso tra l'anticorpo anti-CD38 e il CD38. Tale metodo può essere un metodo *in vitro* o *in vivo*. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo anti-CD38 viene utilizzato per selezionare i soggetti idonei alla terapia con un anticorpo anti-CD38, *ad esempio* quando il CD38 è un biomarcatore per la selezione dei pazienti.

In alcune forme di realizzazione, vengono forniti anticorpi marcati (come anticorpi anti-CD19, anti-CD20, anti-BCMA o anti-CD38 a dominio singolo). Le etichette comprendono, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, etichette o componenti rilevate direttamente (quali etichette fluorescenti, cromoforiche, dense di elettroni, chemiluminescenti e radioattive), così come frazioni, come enzimi o ligandi, che vengono rilevati indirettamente, *ad esempio*, attraverso una reazione enzimatica o interazione molecolare. Le etichette esemplificative includono, ma non solo, i radioisotopi ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , e ^{131}I , i fluorofori come i chelati di terre rare o la fluoresceina e i suoi derivati, la rodamina e i suoi derivati, il dansile, l'umbelliferone, le luciferasi, *ad esempio* la luciferasi di lucciola e la luciferasi batterica (Brevetto U.S. n. 4,737,456), luciferina, 2,3-diidrotalazinedioni, perossidasi di rafano (HRP), fosfatasi alcalina, β -galattosidasi, glucoamilasi, lisozima, saccaridi ossidasi, *ad esempio*, glucosio ossidasi, galattosio ossidasi e glucosio-6-fosfato deidrogenasi, ossidasi eterocicliche come l'uricasi e la xantina ossidasi, accoppiate a un enzima che impiega il perossido di idrogeno per ossidare un precursore di colorante come l'HRP, la lattoperossidasi o la microperossidasi, biotina/avidina, etichette di spin, etichette di batteriofagi, radicali liberi stabili e simili.

III. Recettori antigenici chimerici

Un recettore antigenico chimerico (CAR) può comprendere un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende uno o più anticorpi a dominio singolo (come V_{HH}). Qualsiasi anticorpo a dominio singolo descritto nella Sezione II può essere utilizzato nei CAR qui descritti. Esempi di CAR che comprendono uno o più domini V_{HH} (*vale a dire* CAR basati su V_{HH}) sono illustrati e confrontati con CAR convenzionali che comprendono scFv (*vale a dire* CAR basati su scFv) nelle FIGURE 1A-1D. Un esperto della tecnica riconoscerebbe che i domini V_{HH} nei CAR esemplificativi

delle FIGURE 1A-1D possono essere sostituiti con altri sdAb.

Un recettore antigenico chimerico (CAR) può comprendere un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente a un antigene (come un antigene tumorale); (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. La presente invenzione fornisce un CAR come definito nelle rivendicazioni. In alcune forme di realizzazione, l'antigene è selezionato dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb è camelide, chimerico, umano o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR comprende anche un dominio cerniera (ad esempio un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare legante l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD28, un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD28 e un dominio primario di segnalazione intracellulare derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD28, un primo dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD28, un secondo dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio primario di segnalazione intracellulare derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare derivato da CD3 ζ . Il CAR è monospecifico. Il CAR può essere descritto come multivalente, ad esempio bivalente o trivalente. In alcune forme di realizzazione, il CAR è multispecifico, per esempio bispecifico.

Recettori antigenici chimerici di target specifici

In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione fornisce CAR comprendenti un dominio extracellulare legante l'antigene che comprende uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo (sdAb) anti-CD19, anti-CD20, anti-BCMA o anti-CD38, in cui ciascuno tra il primo e il secondo sdAb è un VHH. I CAR possono essere monospecifici o multispecifici (ad esempio bispecifici o con un numero maggiore di specificità) e i CAR possono essere descritti come multivalenti (ad esempio bivalenti, trivalenti o con un numero maggiore di valenze). Un elenco di recettori antigenici chimerici monospecifici, sequenze, costrutti e vettori esemplificativi è riportato nella Tabella 4 come riferimento.

Le Tabelle 4, 5 e 6 elencate nella sezione "III. "Recettore antigenico chimerico" usano le seguenti abbreviazioni: Es.: esemplificativo/a ; Vett.: vettore; AA: sequenza amminoacidica di CAR; NA: sequenza di acido nucleico di CAR; SP: peptide segnale; Extracellulare: dominio extracellulare di legame con l'antigene; sdAb: anticorpo a dominio singolo; TM: dominio transmembrana; CO1: dominio di segnalazione co-stimolatoria 1; CO2: dominio di segnalazione co-stimolatoria 2; Prim.: dominio di segnalazione intracellulare primario. I domini sono elencati da sinistra a destra di ogni riga che corrisponde all'ordine dei domini dal terminale N al terminale C del polipeptide CAR.

1. CAR CD19

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR dell'invenzione che ha come target CD19 (qui anche denominato "CAR CD19") comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD19; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un dominio di segnalazione costimolatoria derivante da CD28 e un dominio di

segnalazione intracellulare primario derivante da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 è monospecifico. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 è Il CAR CD19 può essere descritto come multispecifico, per esempio bispecifico, multivalente, per esempio bivalente o trivalente.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR CD19 dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD19; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui l'sdAb anti-CD19 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:1, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 comprende inoltre una FR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 240, una FR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 241, una FR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 242 e/o una FR4 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 243. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 comprende un dominio V_HH comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un dominio di segnalazione costimolatoria derivante da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivante da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 è monospecifico. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 è multispecifico, per esempio bispecifico. Il CAR CD19 può essere descritto come multivalente, per esempio bivalente o trivalente.

Viene presentato come riferimento un CAR CD19 comprendente un polipeptide avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 248.

Viene presentato come riferimento un CAR CD19 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 248. Viene anche presentato come riferimento un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 248.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante uno qualsiasi dei CAR CD19 dell'invenzione. Viene presentato come riferimento un acido nucleico isolato avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 250. Viene presentato come riferimento un acido nucleico isolato comprendente la sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 250. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un DNA. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un RNA. In alcune forme di realizzazione, è fornito un vettore comprendente uno qualsiasi degli acidi nucleici codificanti i CAR CD19 dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore di espressione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore virale, come un vettore lentivirale.

2. CAR CD20

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR dell'invenzione che ha come target CD20 (qui anche denominato "CAR CD20") comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD20; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD20 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un dominio di segnalazione costimolatoria derivante da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivante da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 è monospecifico. Qui presentato come

riferimento, il CAR CD20 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 249. In alcune forme di realizzazione, il CAR è multispecifico, per esempio bispecifico. Il CAR CD20 può essere descritto come multivalente, per esempio bivalente o trivalente.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR CD20 dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD20; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui l'sdAb anti-CD20 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:4, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:5 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:6. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD20 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD20 comprende inoltre una FR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 244, una FR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 245, una FR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 246 e/o una FR4 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 247. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD20 comprende un dominio V_HH comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un dominio di segnalazione costimolatoria derivante da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivante da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 è monospecifico. Presentato come riferimento, il CAR CD20 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 249. In alcune forme di realizzazione, il CAR è multispecifico, per esempio bispecifico. Il CAR CD20 può essere descritto come multivalente, per esempio bivalente o trivalente.

Viene qui presentato come riferimento un CAR CD20 comprendente un polipeptide avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:

249. Viene qui presentato come riferimento un CAR CD20 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 249. Viene anche presentato come riferimento un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 249.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante uno qualsiasi dei CAR CD20 dell'invenzione. Viene presentato come riferimento un acido nucleico isolato avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 251. Viene presentato come riferimento un acido nucleico isolato comprendente la sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 251. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un DNA. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un RNA. In alcune forme di realizzazione, è fornito un vettore comprendente uno qualsiasi degli acidi nucleici codificanti i CAR CD20 dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore di espressione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore virale, come un vettore lentivirale.

3. CAR BCMA

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR dell'invenzione che ha come target BCMA (qui indicato anche come " CAR BCMA") comprendente un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA comprende anche un dominio cerniera (ad esempio un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD28, un primo dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD28, un secondo dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio primario di segnalazione intracellulare derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare

di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA è monospecifico.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR BCMA dell'invenzione comprendente un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, dove l'sdAb anti-BCMA comprende uno dei seguenti elementi:

(1) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:18; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:29;

(2) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:8; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:19; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:30;

(3) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:9; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:20; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:31;

(4) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:10; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:21; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:32;

(5) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 11; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:22; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:33;

(6) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:12; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:23; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:34;

(7) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:13; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:24; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:35;

(8) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:14; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:25; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:36;

(9) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:15; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:26; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:37;

(10) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:16; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:27; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:38; o

(11) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:17; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:28; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:39.

In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA comprende un dominio V_HH che comprende una sequenza amminoacidica del gruppo costituito da SEQ ID NO:78-88. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA comprende anche un dominio cerniera (ad esempio un dominio cerniera CD8α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8α, il dominio legante l'antigene extracellulare, un dominio cerniera di CD8α, un dominio transmembrana di CD28, un primo dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28, un secondo dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8α, il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8α, un dominio transmembrana di CD8α, un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA è monospecifico.

Viene presentato come riferimento un CAR BCMA che comprende un polipeptide avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 152-162 e 257-259. Come riferimento, vi è un CAR BCMA che comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 152-162 e 257-259. Viene inoltre presentato come riferimento un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 152-162 e 257-259.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato che codifica una qualsiasi dei CAR BCMA dell'invenzione. È stato presentato come riferimento un acido nucleico isolato avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, l'86%, l'87%, l'88%, l'89%, il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il

94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99% o il 100% di identità con una sequenza di acido nucleico selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 175-185 e 261-263. È stato presentato come riferimento un acido nucleico isolato che comprende una sequenza di acido nucleico selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 175-185 e 261-263. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un DNA. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un RNA. In alcune forme di realizzazione, è fornito un vettore comprendente uno qualsiasi degli acidi nucleici codificanti i CAR BCMA dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore di espressione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore virale, come un vettore lentivirale.

4. CAR CD38

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR dell'invenzione che ha come target CD38 (qui anche denominato "CAR CD38") comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD38; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD38 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un primo dominio di segnalazione costimolatoria derivante da CD28, un secondo dominio di segnalazione costimolatoria derivante da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivante da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivante da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivante da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 è monospecifico.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR CD38 dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD38; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui l'sdAb anti-CD38 comprende uno qualsiasi di quanto segue:

(1) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:40; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:52; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:64;

(2) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:41; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:53; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:65;

(3) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:42; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:54; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:66;

(4) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:43; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:55; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:67;

(5) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:44; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:56; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:68;

(6) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:45; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:57; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:69;

(7) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:46; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:58; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:70;

(8) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:47; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:59; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:71;

(9) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:48; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:60; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:72;

(10) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:49; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:61; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:73;

(11) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:50; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:62; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:74; o

(12) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:51; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:63; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:75.

In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD38 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD38 comprende un dominio V_HH comprendente una sequenza amminoacidica del gruppo costituito da SEQ ID NO:89-100. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8α, il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8α, un dominio transmembrana CD28, un primo dominio di segnalazione costimolatoria derivante da CD28, un secondo dominio di segnalazione costimolatoria derivante da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivante da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8α, il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8α, un dominio transmembrana CD8α, un dominio di segnalazione costimolatoria derivante da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivante da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 è monospecifico.

Viene presentato come riferimento un CAR CD38 comprendente un polipeptide avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto a una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 163-174 e 260. Viene presentato come riferimento un CAR CD38 comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 163-174 e 260. Viene anche presentato come riferimento un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 163-174 e 260.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante uno qualsiasi dei CAR CD38 dell'invenzione. Viene presentato come riferimento un acido nucleico isolato avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto a una sequenza di acido nucleico selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 186-197 e 264. Viene presentato come riferimento un acido nucleico isolato comprendente una sequenza di acido nucleico selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 186-197 e 264. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un DNA. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un RNA. In alcune forme di realizzazione, è fornito un vettore comprendente uno qualsiasi degli acidi nucleici codificanti i CAR CD38 dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore di espressione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore virale, come un vettore lentivirale.

5. CAR CD22

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR dell'invenzione che ha come target CD22 (qui anche denominato "CAR CD22") comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD22; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD22 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD22 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD22 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un primo dominio di segnalazione costimolatoria derivante da CD28, un secondo dominio di segnalazione costimolatoria derivante da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivante da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivante da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivante da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR CD22 è monospecifico.

Tabella 4. Esempi di CAR monospecifici e monovalenti. (divulgati come riferimento)

Nome es. del	AA	NA SEQ ID es.	SP	Extracellu-lare.	Cerniera	T	Segnalazione intracellulare
--------------	----	---------------	----	------------------	----------	---	-----------------------------

vettore o del CAR	SEQ ID es.			sdAb		M	CO1	CO2	Prim.
CAR BCMA									
PLVX-hEF1a-269A37346	152	175	CD8 α	269A37 346	CD8 α	C D2 8	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-269A37348	153	176	CD8 α	269A37 348	CD8 α	C D2 8	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-269A37917	154	177	CD8 α	269A37 917	CD8 α	C D2 8	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-269A37355	155	178	CD8 α	269A37 355	CD8 α	C D2 8	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-269A37915	156	179	CD8 α	269A37 915	CD8 α	C D2 8	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-269A37936	157	180	CD8 α	269A37 936	CD8 α	C D2 8	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-269A37953	158	181	CD8 α	269A37 953	CD8 α	C D2 8	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-269A37965	159	182	CD8 α	269A37 965	CD8 α	C D2 8	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-269A37972	160	183	CD8 α	269A37 972	CD8 α	C D2 8	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-269A37353	161	184	CD8 α	269A37 353	CD8 α	C D2 8	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-269A37948	162	185	CD8 α	269A37 948	CD8 α	C D2 8	CD28	CD137	CD3 ζ
GSI5011 CAR	257	261	CD8 α	269A37 346	CD8 α	C D8 α	CD137	NA	CD3 ζ
GSI5019 CAR	258	262	CD8 α	269A37 353	CD8 α	C D8 α	CD137	NA	CD3 ζ
GSI5020 CAR	259	263	CD8 α	269A37 917	CD8 α	C D8 α	CD137	NA	CD3 ζ
CAR CD38									
PLVX-hEF1a-38A37333	163	186	CD8 α	38A373 33	CD8 α		CD28	CD28	CD137 CD3 ζ
PLVX-hEF1a-38A37336	164	187	CD8 α	38A373 36	CD8 α		CD28	CD28	CD137 CD3 ζ
PLVX-hEF1a-38A37699	165	188	CD8 α	38A376 99	CD8 α		CD28	CD28	CD137 CD3 ζ
PLVX-hEF1a-38A37331	166	189	CD8 α	38A373 31	CD8 α		CD28	CD28	CD137 CD3 ζ
PLVX-hEF1a-38A37717	167	190	CD8 α	38A377 17	CD8 α		CD28	CD28	CD137 CD3 ζ
PLVX-hEF1a-38A37719	168	191	CD8 α	38A377 19	CD8 α		CD28	CD28	CD137 CD3 ζ
PLVX-hEF1a-38A37330	169	192	CD8 α	38A373 30	CD8 α		CD28	CD28	CD137 CD3 ζ
PLVX-hEF1a-	170	193	CD8 α	38A373	CD8 α		CD28	CD28	CD137 CD3 ζ

38A37334				34					
PLVX-hEF1a-38A37730	171	194	CD8 α	38A37730	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-38A37340	172	195	CD8 α	38A37340	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-38A37731	173	196	CD8 α	38A37731	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-38A37326	174	197	CD8 α	38A37326	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
CD19 V _H H CAR	248	250	CD8 α	CD19 V _H H	CD8 α	CD28	CD28	NA	CD3 ζ
CD20 V _H H CAR	249	251	CD8 α	CD20 V _H H	CD8 α	CD28	CD28	NA	CD3 ζ
GS15012 CAR	260	264	CD8 α	38A37717	CD8 α	CD8 α	CD137	NA	CD3 ζ

Recettori antigenici chimerici multivariati

La presente invenzione in alcune forme di realizzazione fornisce CAR multivalenti dell'invenzione aventi due o più (come circa 2, 3, 4, 5, 6 o più) siti di legame all'antigene comprendenti anticorpi a dominio singolo come definito nelle rivendicazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente ha come target un singolo antigene e comprende due o più siti di legame per il singolo antigene. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente ha come target più di un antigene e il CAR multivalente comprende due o più siti di legame per almeno un antigene. I siti di legame specifici per lo stesso antigene possono legarsi allo stesso epitopo dell'antigene o ad epitopi diversi dell'antigene. I siti di legame specifici per lo stesso antigene possono comprendere anticorpi a dominio singolo uguali o diversi.

In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione fornisce un recettore antigenico chimerico multivalente (ad esempio bivalente, trivalente o con un numero maggiore di valenze) dell'invenzione comprendente un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende una pluralità (ad esempio circa 2, 3, 4, 5, 6 o più) di anticorpi a dominio singolo (sdAb) che si legano specificamente a un antigene (ad esempio un antigene tumorale); (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'antigene è selezionato dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77. In alcune forme di realizzazione, la pluralità di sdAb è camelide, chimerica o umanizzata. In alcune forme di realizzazione, la pluralità di anticorpi a dominio singolo è fusa reciprocamente tramite legami peptidici o linker peptidici. In alcune forme di realizzazione, ciascun linker peptidico ha una lunghezza massima di circa 50 (ad esempio non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione

intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente comprende inoltre un dominio cerniera (ad esempio un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente comprende inoltre un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente è monospecifico. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente è multispecifico, ad esempio bispecifico.

In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione fornisce un recettore antigenico chimerico multivalente (ad esempio bivalente, trivalente o con un numero maggiore di valenze) dell'invenzione comprendente un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un primo anticorpo a dominio singolo che si lega specificamente a un primo epitopo di un antigene (ad esempio un antigene tumorale) e un secondo anticorpo a dominio singolo che si lega specificamente a un secondo epitopo dell'antigene; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, dove il primo epitopo e il secondo epitopo sono diversi. In alcune forme di realizzazione, l'antigene è selezionato dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb e/o il secondo sdAb sono camelidi, chimerici o umanizzati. In alcune forme di realizzazione, il primo anticorpo a dominio singolo e il secondo anticorpo a dominio singolo sono fusi l'uno all'altro tramite un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (ad esempio non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7,

LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente comprende inoltre un dominio cerniera (ad esempio un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente comprende inoltre un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente è monospecifico. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente è multispecifico, ad esempio bispecifico.

I CAR multivalenti qui descritti possono essere particolarmente adatti per colpire antigeni multimerici attraverso il legame sinergico dei diversi siti di legame con l'antigene, o per aumentare l'affinità o l'avidità di legame con l'antigene. Uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo qui descritti, come gli anticorpi anti-CD19, anti-CD20, anti-BCMA o anti-CD38, può essere utilizzato nel dominio extracellulare di legame con l'antigene dei CAR multivalenti qui descritti. Un elenco di recettori antigenici chimerici monospecifici multivariati esemplificativi, di sequenze esemplificative, di costrutti e di vettori di questi ultimi è riportato nella Tabella 5.

1. CAR BCMA Multivalente

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR multivalente dell'invenzione che ha come target BCMA (qui anche denominato "CAR BCMA multivalente") comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente una pluralità (come 2, 3 o più) di sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, la pluralità di sdAb anti-BCMA è fusa reciprocamente tramite legami peptidici o linker peptidici. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (ad esempio non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente comprende inoltre un dominio cerniera (ad esempio un dominio cerniera

CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente comprende inoltre un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente è bivalente. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente è trivalente. Qualsiasi sdAb anti-BCMA può essere utilizzato per costruire il CAR BCMA multivalente.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR BCMA multivalente dell'invenzione comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente una pluralità (come 2, 3 o più) di sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui l'sdAb anti-BCMA comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 18 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:29. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA comprende un dominio V_HH comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:78. In alcune forme di realizzazione, la pluralità di sdAb anti-BCMA è fusa reciprocamente mediante legami peptidici o linker peptidici. In alcune forme di realizzazione, ciascun linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente comprende inoltre un dominio cerniera (ad esempio un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente comprende inoltre un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare

primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente è bivalente., In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente è trivalente.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR BCMA multivalente dell'invenzione comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un primo sdAb anti-BCMA e un secondo sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui il primo sdAb anti-BCMA e il secondo sdAb anti-BCMA si legano specificamente ad epitopi diversi su BCMA. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb anti-BCMA è localizzato in corrispondenza del terminale N del secondo sdAb anti-BCMA. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb anti-BCMA è localizzato in corrispondenza del terminale C del secondo sdAb anti-BCMA. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb anti-BCMA e il secondo sdAb anti-BCMA sono fusi l'uno all'altro mediante un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente è bivalente. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente è trivalente. In alcune forme di realizzazione, il dominio extracellulare di legame con l'antigene comprende inoltre un terzo sdAb anti-BCMA che si lega specificamente a un epitopo diverso da quello del primo e del secondo sdAb anti-BCMA. Uno qualsiasi degli sdAb anti-BCMA può essere utilizzato per costruire il CAR BCMA multivalente.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR BCMA multivalente dell'invenzione che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un primo sdAb anti-BCMA e un secondo sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di

segnalazione intracellulare, dove il primo sdAb anti-BCMA comprende un CDR1 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 16, una CDR2 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:27 e una CDR3 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:38; e dove la seconda sdAb anti-BCMA comprende una CDR1 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:9, una CDR2 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:20 e una CDR3 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:31. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb anti-BCMA comprende un dominio V_HH con la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 87. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb anti-BCMA comprende un dominio V_HH con la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 80. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb anti-BCMA è localizzato in corrispondenza del terminale N del secondo sdAb anti-BCMA. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb anti-BCMA è localizzato in corrispondenza del terminale C del secondo sdAb anti-BCMA. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb anti-BCMA e il secondo sdAb anti-BCMA sono fusi l'uno all'altro tramite un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente comprende anche un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8α, il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8α, un dominio transmembrana di CD8α, un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA multivalente è bivalente.

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un CAR BCMA multivalente dell'invenzione che comprende un polipeptide avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 198-199 e 265-270. In alcune forme di realizzazione, viene fornito un CAR BCMA

multivalente dell'invenzione che comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 198-199 e 265-270. Viene inoltre fornito un polipeptide che comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 198-199 e 265-270.

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un acido nucleico isolato che codifica uno qualsiasi dei CAR BCMA multivalenti dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, viene fornito un acido nucleico isolato avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con una sequenza di acido nucleico selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 202-203 e 271-276. In alcune forme di realizzazione, viene fornito un acido nucleico isolato che comprende una sequenza di acido nucleico selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 202-203 e 271-276. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un DNA. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un RNA. In alcune forme di realizzazione, è disponibile un vettore che comprende uno qualsiasi degli acidi nucleici che codificano i CAR BCMA multivalenti dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore di espressione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore virale, ad esempio un vettore lentivirale.

2. CAR CD38 multivalente

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR multivalente dell'invenzione che ha come target CD38 (qui anche denominato "CAR CD38 multivalente") comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente una pluralità (come 2, 3 o più) di sdAb anti-CD38; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD38 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, la pluralità di sdAb anti-CD38 è fusa reciprocamente mediante legami peptidici o linker peptidici. In alcune forme di realizzazione, ciascun linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 multivalente comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 multivalente comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il

dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 multivalente è bivalente. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 multivalente è trivalente. Uno qualsiasi degli sdAb anti-CD38 può essere utilizzato per costruire il CAR CD38 multivalente.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR CD38 multivalente dell'invenzione comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente una pluralità di sdAb anti-CD38; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui ciascuno della pluralità di sdAb anti-CD38 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:44, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:56 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:68. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD38 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, ciascuno della pluralità di sdAb anti-CD38 comprende un dominio V_HH comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:93. In alcune forme di realizzazione, la pluralità di sdAb anti-CD38 è fusa reciprocamente mediante legami peptidici o linker peptidici. In alcune forme di realizzazione, ciascun linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 multivalente comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 multivalente comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 multivalente è bivalente. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 multivalente è trivalente.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR CD38 multivalente dell'invenzione comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un primo sdAb anti-CD38 e un secondo sdAb anti-CD38; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui il primo sdAb anti-CD38 e il secondo sdAb anti-CD38 si legano specificamente ad epitopi diversi su CD38. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb anti-CD38 è localizzato in corrispondenza del terminale N del secondo sdAb anti-CD38. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb anti-CD38 è localizzato in corrispondenza del terminale C del secondo sdAb anti-CD38. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb anti-CD38 e il secondo sdAb anti-CD38 sono fusi l'uno all'altro mediante un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 multivalente comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 multivalente comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 multivalente è bivalente. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 multivalente è trivalente. In alcune forme di realizzazione, il dominio extracellulare di legame con l'antigene comprende inoltre un terzo sdAb anti-CD38 che si lega specificamente a un epitopo diverso da quello del primo e del secondo sdAb anti-CD38. Uno qualsiasi degli sdAb anti-CD38 può essere utilizzato per costruire il CAR CD38 multivalente.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR CD38 multivalente dell'invenzione comprendente un polipeptide avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 200 o di SEQ ID NO: 201. In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR CD38 multivalente dell'invenzione

comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 200 o di SEQ ID NO: 201. È fornito inoltre un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 200 o di SEQ ID NO: 201.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante uno qualsiasi dei CAR CD38 multivalenti dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza rispetto alla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 204 o di SEQ ID NO: 205.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato comprendente la sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 204 o di SEQ ID NO: 205. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un DNA. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un RNA. In alcune forme di realizzazione, è fornito un vettore comprendente uno qualsiasi degli acidi nucleici codificanti i CAR CD38 multivalenti dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore di espressione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore virale, come un vettore lentivirale.

3. Altri CAR multivalenti esemplificativi

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR multivalente dell'invenzione che ha come target CD19 (qui anche denominato "CAR CD19 multivalente") comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente una pluralità (come 2, 3 o più) di sdAb anti-CD19; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, la pluralità di sdAb anti-CD19 è fusa reciprocamente mediante legami peptidici o linker peptidici. In alcune forme di realizzazione, ciascun linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 multivalente comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 multivalente comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame

con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 multivalente è bivalente. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 multivalente è trivalente. Uno qualsiasi degli sdAb anti-CD19 può essere utilizzato per costruire il CAR CD19 multivalente.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR multivalente dell'invenzione che ha come target CD20 (qui anche denominato "CAR CD20 multivalente") comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente una pluralità (come 2, 3 o più) di sdAb anti-CD20; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD20 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, la pluralità di sdAb anti-CD20 è fusa reciprocamente mediante legami peptidici o linker peptidici. In alcune forme di realizzazione, ciascun linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 multivalente comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 multivalente comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 multivalente è bivalente. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 multivalente è trivalente. Uno qualsiasi degli sdAb anti-CD20 può essere utilizzato per costruire il CAR CD20 multivalente.

In alcune forme di realizzazione, è fornito un CAR multivalente dell'invenzione che ha come target CD22 (qui anche denominato "CAR CD22 multivalente") comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente una pluralità (come 2, 3 o più) di sdAb anti-CD22; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD22 è camelide,

chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, la pluralità di sdAb anti-CD22 è fusa reciprocamente mediante legami peptidici o linker peptidici. In alcune forme di realizzazione, ciascun linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD22 multivalente comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD22 multivalente comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR CD22 multivalente è bivalente. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD22 multivalente è trivalente.

Tabella 5. Esempi di CAR monospecifici e multivalenti.

CAR	Es. AA SEQ ID	Es. NA SEQ ID	SP	Dominio extracellulare di legame con l'antigene					Cerniera	TM	Segnalazione intracellulare	
				sdAb #1	Lnk. #1 SEQ ID	sdAb #2	Lnk. #2 SEQ ID	sdAb #3			CO 1	Prim.
GSI5 014	198	202	CD 8 α	269A 3734 6	144	269A 3734 6	NA	NA	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 015	199	203	CD 8 α	269A 3734 6	144	269A 3734 6	144	269A 3734 6	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 016	200	204	CD 8 α	3 8 A3 7717	144	38A3 7717	NA	NA	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 017	201	205	CD 8 α	3 8 A3 7717	144	38A3 7717	144	38A3 7717	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 021	265	271	CD 8 α	269A 3735 3	144	269A 3791 7	NA	NA	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 022	266	272	CD 8 α	269A 3735 3	149	269A 3791 7	NA	NA	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 023	267	273	CD 8 α	269A 3735 3	151	269A 3791 7	NA	NA	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ

GSI5 024	268	274	CD 8 α	269A 3791 7	145	269A 3735 3	NA	NA	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 025	269	275	CD 8 α	269A 3791 7	149	269A 3735 3	NA	NA	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 026	270	276	CD 8 α	269A 3791 7	150	269A 3735 3	NA	NA	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ

Recettore chimerico multispecifico dell'antigene

La presente invenzione fornisce inoltre recettori antigenici chimerici multispecifici dell'invenzione che hanno come target due o più (ad esempio circa 2, 3, 4, 5, 6 o più) antigeni diversi. In alcune forme di realizzazione, il CAR multispecifico ha un sito di legame per ciascun antigene. In alcune forme di realizzazione, il CAR multispecifico ha più di due siti di legame per almeno un antigene. Ogni sito di legame dell'antigene può comprendere un anticorpo a dominio singolo. Ad esempio, in alcune forme di realizzazione, il recettore chimerico multispecifico dell'antigene è un CAR bispecifico che comprende un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende due diversi sdAb, ciascuno dei quali si lega specificamente a un antigene. In alcune forme di realizzazione, il CAR multispecifico è un CAR trispecifico che comprende un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende tre diversi sdAb, ognuno dei quali si lega specificamente a un antigene.

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un recettore antigenico chimerico (CAR) multispecifico (ad esempio bispecifico) dell'invenzione comprendente un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un primo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente a un primo antigene (ad esempio un primo antigene tumorale) e un secondo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente a un secondo antigene (ad esempio un secondo antigene tumorale); (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, dove il primo antigene è diverso dal secondo antigene. In alcune forme di realizzazione, il primo antigene e/o il secondo antigene sono selezionati dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb e/o il secondo sdAb sono camelidi, chimerici o umanizzati. In alcune forme di realizzazione, il primo anticorpo a dominio singolo e il secondo anticorpo a dominio singolo sono fusi l'uno all'altro tramite un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune

forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR multispecifico comprende anche un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR multispecifico comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8α, il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8α, un dominio transmembrana di CD8α, un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8α, il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8α, un dominio transmembrana di CD28, un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3ζ.

A seconda dell'antigene desiderato da colpire, i CAR possono essere ingegnerizzati in modo da includere gli appropriati anticorpi a dominio singolo specifici per gli antigeni desiderati. Uno o più degli anticorpi anti-CD19, anti-CD20, anti-BCMA o anti-CD38 qui descritti possono essere utilizzati nel dominio extracellulare di legame con l'antigene nei CAR. Gli anticorpi a dominio singolo possono essere disposti in qualsiasi ordine adeguato. Ad esempio, il primo anticorpo a dominio singolo è fuso al terminale N o al terminale C del secondo anticorpo a dominio singolo. Un opportuno linker peptidico può essere posizionato tra diversi anticorpi a dominio singolo per evitare ostacoli sterici tra gli anticorpi a dominio singolo. Un elenco di recettori antigenici chimerici bispecifici esemplificativi, sequenze esemplificative, costrutti e vettori degli stessi sono riportati nella Tabella 6.

1. CAR BCMA × CD38

In alcune forme di realizzazione, il CAR della presente invenzione è un CAR bispecifico che ha come target simultaneo il BCMA e il CD38. Ad esempio, il BCMA e il CD38 possono essere utilizzati come candidati per colpire gli antigeni espressi dalle cellule del mieloma multiplo.

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un recettore antigenico chimerico multispecifico (ad esempio bispecifico) dell'invenzione che ha come bersaglio BCMA e CD38 (qui indicato anche come "CAR BCMA × CD38") che comprende un polipeptide che include: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un primo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente al BCMA e un secondo anticorpo a dominio singolo che si lega specificamente al CD38; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme

di realizzazione, il primo sdAb e/o il secondo sdAb sono camelidi, chimerici o umanizzati. In alcune forme di realizzazione, il primo anticorpo a dominio singolo e il secondo anticorpo a dominio singolo sono fusi l'uno all'altro tramite un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è fuso al terminale N del secondo sdAb. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è fuso al terminale C del secondo sdAb. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 144-151. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA \times CD38 comprende anche un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA \times CD38 comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ .

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un recettore antigenico chimerico multispecifico (ad esempio bispecifico) dell'invenzione che ha come bersaglio BCMA e CD38 (qui indicato anche come "CAR BCMA \times CD38") che comprende un polipeptide che include: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un anticorpo anti-BCMA a dominio singolo e un anticorpo anti-CD38 a dominio singolo; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, dove l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo comprende una CDR1 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7, una CDR2 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 18, e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:29; e dove l'anticorpo anti-CD38 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:44, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:56, e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:68. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA e/o l'sdAb anti-CD38 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di

realizzazione, gli sdAb anti-BCMA comprendono un dominio V_HH che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:78. In alcune forme di realizzazione, gli sdAb anti-CD38 comprendono un dominio V_HH che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:93. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA e l'sdAb anti-CD38 sono fusi l'uno all'altro tramite un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA è fuso al terminale N dell'sdAb anti-CD38. In alcune forme di realizzazione, il primo anti-BCMA è fuso al terminale C dell'sdAb anti-CD38. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 144-151. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA \times CD38 comprende anche un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA \times CD38 comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide dell'invenzione.

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un CAR BCMA \times CD38 che comprende un polipeptide comprendente dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , un anticorpo a dominio singolo anti-CD38, un linker peptidico, un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ ; dove l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprende una CDR1 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 18, e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:29; e dove l'anticorpo anti-CD38 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:44, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:56, e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:68. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ

ID NO: 144-151. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA × CD38 comprende un polipeptide che presenta almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 207-211. In alcune forme di realizzazione, è disponibile un CAR BCMA × CD38 che comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 207-211. Viene inoltre fornito un polipeptide che comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 207-211.

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un CAR BCMA × CD38 dell'invenzione che comprende un polipeptide comprendente dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , un anticorpo anti-BCMA a dominio singolo, un linker peptidico, un anticorpo anti-CD38 a dominio singolo, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ ; dove l'anticorpo anti-BCMA a dominio singolo comprende un CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:18 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:29; e dove l'anticorpo anti-CD38 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:44, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:56 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:68. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 144-151. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA × CD38 comprende un polipeptide che presenta almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 212-216. In alcune forme di realizzazione, è disponibile un CAR BCMA × CD38 che comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 212-216. Viene inoltre fornito un polipeptide che comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 212-216.

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un acido nucleico isolato che codifica uno qualsiasi dei CAR BCMA × CD38 dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, viene fornito un acido nucleico isolato avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con una sequenza di acido nucleico selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO:218-227. In alcune forme di realizzazione, viene fornito un acido nucleico isolato che comprende una sequenza di acido nucleico selezionata dal gruppo composto da SEQ ID NO:218-227. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un DNA. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un RNA. In alcune forme di realizzazione, è disponibile un vettore che comprende uno qualsiasi degli acidi

nucleici che codificano i CAR BCMA × CD38 dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore di espressione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore virale, ad esempio un vettore lentivirale.

2. CAR CD19 × CD20

In alcune forme di realizzazione, gli antigeni di differenziazione delle cellule B, come il CD19 e il CD20, sono candidati come antigeni target nel linfoma a cellule B. Alcuni di questi antigeni sono stati utilizzati come target per l'immunoterapia passiva con anticorpi monoclonali, con un successo limitato. In alcune forme di realizzazione, il CAR della presente invenzione è un CAR bispecifico che ha come target simultaneo CD19 e CD20.

In alcune forme di realizzazione, è disponibile un recettore antigenico chimerico multispecifico (ad esempio bispecifico) dell'invenzione che ha come target il CD19 e il CD20 (qui indicato anche come "CAR CD19 × CD20") comprendente un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un primo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente al CD19 e un secondo anticorpo a dominio singolo che si lega specificamente al CD20; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb e/o il secondo sdAb sono camelidi, chimerici o umanizzati. In alcune forme di realizzazione, il primo anticorpo a dominio singolo e il secondo anticorpo a dominio singolo sono fusi l'uno all'altro tramite un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è fuso al terminale N del secondo sdAb. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb è fuso al terminale C del secondo sdAb. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 144-151. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 × CD20 comprende anche un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 × CD20 comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide

segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD28, un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ .

In alcune forme di realizzazione, è disponibile un recettore antigenico chimerico multispecifico (ad esempio bispecifico) dell'invenzione che ha come target il CD19 e il CD20 (qui indicato anche come "CAR CD19 \times CD20") comprendente un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 e un anticorpo a dominio singolo anti-CD20; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, dove l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprende una CDR1 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2, e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3; e dove l'anticorpo anti-CD20 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:4, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:5, e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:6. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 e/o l'sdAb anti-CD20 sono camelidi, chimerici o umanizzati. In alcune forme di realizzazione, gli sdAb anti-CD19 comprendono un dominio VHH che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:76. In alcune forme di realizzazione, gli sdAb anti-CD20 comprendono un dominio VHH che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:77. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 e l'sdAb anti-CD20 sono fusi l'uno all'altro attraverso un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, l'anti-CD19 sdAb è fuso al terminale N dell'anti-CD20 sdAb. In alcune forme di realizzazione, il primo anti-CD19 è fuso al terminale C dell'sdAb anti-CD20. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 146. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 \times CD20 comprende anche un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 \times CD20 comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide.

In alcune forme di realizzazione, è disponibile un CAR CD19 × CD20 dell'invenzione che comprende un polipeptide comprendente dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , un anticorpo anti-CD19 a dominio singolo, un linker peptidico, un anticorpo anti-CD20 a dominio singolo, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ ; dove l'anticorpo anti-CD19 a dominio singolo comprende un CDR1 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2, e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3; e dove l'anticorpo anti-CD20 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:4, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:5, e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:6. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 146. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 × CD20 comprende un polipeptide che presenta almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 206. In alcune forme di realizzazione, è disponibile un CAR CD19 × CD20 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 206. Viene inoltre fornito un polipeptide che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 206.

In alcune forme di realizzazione, viene fornito un acido nucleico isolato che codifica uno qualsiasi dei CAR CD19 × CD20 dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, viene fornito un acido nucleico isolato avente almeno circa uno qualsiasi tra l'85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza con la sequenza dell'acido nucleico di SEQ ID NO:217. In alcune forme di realizzazione, viene fornito un acido nucleico isolato che comprende la sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO:217. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un DNA. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico isolato è un RNA. In alcune forme di realizzazione, è disponibile un vettore che comprende uno qualsiasi degli acidi nucleici che codificano i CAR CD19 × CD20 descritti sopra. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore di espressione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore virale, ad esempio un vettore lentivirale. Attualmente, le immunoterapie che hanno come target il CD19 hanno ottenuto notevoli risultati negli studi clinici. Gli studi clinici basati sulle cellule CAR-T CD19 per il trattamento a breve termine dell'ALL possono raggiungere circa il 90% di efficacia di remissione completa. Tuttavia, circa il 10% dei pazienti ha avuto una ricaduta dopo pochi mesi di trattamento. Il motivo principale è che il CD19 è stato perso durante la maturazione delle cellule B in plasmacellule e le cellule tumorali residue hanno prodotto le varianti di fuga della perdita dell'antigene CD19. I CAR CD19 × CD20 qui descritti possono avere come target simultaneo gli antigeni di superficie tumorale CD19 e CD20, il che può potenziare l'attività antitumorale delle cellule T

sistemiche e ridurre i fenomeni di fuga dal target che hanno causato almeno il 30% delle ricadute leucemiche dopo la terapia CAR.

3. Altri CAR multispecifici esemplificativi

In alcune forme di realizzazione, è disponibile un recettore antigenico chimerico multispecifico (ad esempio bispecifico) dell'invenzione che ha come target il CD19 e il CD22 (qui indicato anche come "CAR CD19 × CD22") comprendente un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 e un anticorpo a dominio singolo anti-CD22; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 e/o l'sdAb anti-CD22 sono camelidi, chimerici o umanizzati. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-CD22 a dominio singolo e l'anticorpo anti-CD22 a dominio singolo sono fusi l'uno all'altro tramite un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, l'anti-CD19 sdAb è fuso al terminale N dell'anti-CD22 sdAb. In alcune forme di realizzazione, l'anti-CD19 sdAb è fuso al terminale C dell'anti-CD22 sdAb. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 144-151. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 × CD22 comprende anche un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 × CD22 comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD28, un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In

alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-CD19 a dominio singolo comprende una CDR1 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:1, una CDR2 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2 e una CDR3 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3.

In alcune forme di realizzazione, è disponibile un recettore antigenico chimerico multispecifico (ad esempio bispecifico) dell'invenzione che ha come target il CD19 e il BCMA (qui indicato anche come "CAR CD19 × BCMA ") che comprende un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 e un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 e/o l'sdAb anti-BCMA è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA e l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA sono fusi l'uno all'altro tramite un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è fuso al terminale N dell'sdAb anti-BCMA. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è fuso al terminale C dell'sdAb anti-BCMA. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 144-151. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 × BCMA comprende anche un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 × BCMA comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di

CD8 α , un dominio transmembrana di CD28, un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-CD19 a dominio singolo comprende una CDR1 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:1, una CDR2 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2 e una CDR3 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3.

Tabella 6. Esempi di CAR bispecifici.

CAR	AA SEQ ID es.	NA SEQ ID es.	SP	Dominio extracellulare di legame con l'antigene			Cerniera	TM	CO1	Intra.
				sdAb #1	SEQ ID del linker	sdAb# 2				
CD19 \times CD20	206	217	CD8 α	CD19 V _H H	146	CD20 V _H H	CD8 α	CD28	CD28	CD3 ζ
GS15 001	207	218	CD8 α	38A37 717	144	269A3 7346	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GS15 002	208	219	CD8 α	38A37 717	145	269A3 7346	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GS15 003	209	220	CD8 α	38A37 717	146	269A3 7346	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GS15 004	210	221	CD8 α	38A37 717	147	269A3 7346	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GS15 005	211	222	CD8 α	38A37 717	148	269A3 7346	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GS15 006	212	223	CD8 α	269A3 7346	144	38A37 717	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GS15 007	213	224	CD8 α	269A3 7346	145	38A37 717	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GS15 008	214	225	CD8 α	269A3 7346	146	38A37 717	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GS15 009	215	226	CD8 α	269A3 7346	147	38A37 717	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ
GS15 010	216	227	CD8 α	269A3 7346	148	38A37 717	CD8 α	CD8 α	CD137	CD3 ζ

Dominio extracellulare di legame con l'antigene

Il dominio extracellulare di legame con l'antigene dei CAR dell'invenzione comprende un primo e un secondo sdAb, ciascuno dei quali è un VHH.

Gli anticorpi a dominio singolo possono essere fusi tra loro direttamente tramite legami peptidici o tramite linker peptidici.

1. Anticorpi a dominio singolo

I CAR della presente invenzione comprendono un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un primo e un secondo sdAb, ciascuno dei quali è un VHH. Gli sdAb possono avere la stessa origine o origini diverse e dimensioni uguali o diverse. Esempi di sdAb includono,

ma non sono limitati a, domini variabili a catena pesante da anticorpi a sola catena pesante (*ad esempio*, V_{HH} o V_{NAR}), molecole leganti naturalmente prive di catene leggere, domini singoli (come V_H o V_L) derivati da anticorpi convenzionali a 4 catene, anticorpi umanizzati a sola catena pesante, anticorpi umani a dominio singolo prodotti da topi o ratti transgenici che esprimono segmenti di catena pesante umana, e domini ingegnerizzati e impalcature a dominio singolo diverse da quelle derivate da anticorpi. Per costruire i CAR qui descritti è possibile utilizzare qualsiasi sdAb noto nella tecnica o sviluppato dagli inventori, compresi gli anticorpi a dominio singolo descritti nella Sezione di cui sopra. Gli sdAb possono essere derivati da qualsiasi specie, tra cui, ma non solo, topo, ratto, esseri umani, cammello, lama, lampreda, pesce, squalo, capra, coniglio e bovino. Gli anticorpi a dominio singolo qui contemplati comprendono anche molecole di anticorpi a dominio singolo presenti in natura provenienti da specie diverse dai *camelidi* e dagli squali.

In alcune forme di realizzazione, l'sdAb è derivato da una molecola a dominio singolo legante l'antigene presente in natura, nota come anticorpo a catena pesante privo di catene leggere (qui indicato anche come "anticorpi a sola catena pesante"). Tali molecole a dominio singolo sono descritte in WO 94/04678 e Hamers-Casterman, C. *et al.* (1993) *Nature* 363:446-448, ad esempio. Per motivi di chiarezza, il dominio variabile derivato da una molecola a catena pesante naturalmente priva di catena leggera è qui noto come V_{HH} per distinguerlo dal V_H convenzionale delle immunoglobuline a quattro catene. Tale molecola V_{HH} può essere derivata da anticorpi allevati in specie di *camelidi*, ad esempio cammello, lama, vigogna, dromedario, alpaca e guanaco. Altre specie oltre ai camelidi possono produrre molecole a catena pesante naturalmente prive di catena leggera e tali V_{HH} rientrano nell'ambito della presente invenzione.

Le molecole V_{HH} dei camelidi sono circa 10 volte più piccole delle molecole IgG. Sono polipeptidi singoli e possono essere molto stabili, resistendo a condizioni estreme di pH e temperatura. Inoltre, possono essere resistenti all'azione delle proteasi, cosa che non avviene per gli anticorpi convenzionali a 4 catene. Inoltre, l'espressione *in vitro* delle V_{HH} produce V_{HH} funzionali ad alta resa e correttamente ripiegate. Inoltre, gli anticorpi generati nei camelidi possono riconoscere epitopi diversi da quelli riconosciuti dagli anticorpi generati *in vitro* attraverso l'uso di librerie di anticorpi o attraverso l'immunizzazione di mammiferi diversi dai camelidi (vedere, ad esempio, WO9749805). Pertanto, i CAR multispecifici o multivalenti che comprendono uno o più domini V_{HH} possono interagire in modo più efficiente con i target rispetto ai CAR multispecifici o multivalenti che comprendono frammenti di legame con l'antigene derivati da anticorpi convenzionali a 4 catene. Poiché è noto che i V_{HH} si legano a epitopi "insoliti" come cavità o scanalature, l'affinità dei CAR che comprendono tali V_{HH} può essere più adatta al trattamento terapeutico rispetto ai polipeptidi multispecifici convenzionali.

In alcune forme di realizzazione, l'sdAb deriva da una regione variabile dell'immunoglobulina presente nei pesci cartilaginei. Ad esempio, l'sdAb può

essere derivato dall'isotipo di immunoglobulina noto come nuovo recettore antigenico (NAR) presente nel siero dello squalo. I metodi di produzione di molecole a dominio singolo derivate da una regione variabile dei NAR ("IgNAR") sono descritti in WO 03/014161 e Streltsov (2005) *Protein Sci.* 14:2901-2909.

In alcune forme di realizzazione, l'sdAb è ricombinante, innestato in CDR, umanizzato, cammellizzato, de-immunizzato e/o generato *in vitro* (ad esempio, selezionato mediante visualizzazione fago). In alcune forme di realizzazione, la sequenza amminoacidica delle regioni di struttura può essere alterata mediante "cammellizzazione" di specifici residui amminoacidici nelle regioni di struttura. La cammellizzazione si riferisce alla sostituzione di uno o più residui amminoacidici nella sequenza amminoacidica di un dominio V_H (presente in natura) di un anticorpo convenzionale a 4 catene con uno o più residui amminoacidici presenti nella posizione corrispondente di un dominio V_HH di un anticorpo a catena pesante. Questa operazione può essere eseguita in un modo noto di per sé, che sarà chiaro alla persona esperta, ad esempio sulla base delle ulteriori descrizioni qui riportate. Tali sostituzioni "cammellizzanti" sono preferibilmente inserite in posizioni amminoacidiche che formano e/o sono presenti nell'interfaccia V_H-V_L, e/o nei cosiddetti residui cammellizzanti, come qui definiti (vedere ad esempio WO 94/04678, Davies e Riechmann FEBS Letters 339: 285-290, 1994; Davies e Riechmann Protein Engineering 9 (6): 531-537, 1996; Riechmann J. Mol. Biol. 259: 957-969, 1996; e Riechmann e Muyldermans J. Immunol. Met. 231: 25-38, 1999).

L'sdAb può essere un anticorpo umano a dominio singolo prodotto da topi o ratti transgenici che esprimono segmenti di catena pesante umana. Vedere, ad esempio, US20090307787A1, il Brevetto U.S. n. 8,754,287, US20150289489A1, US20100122358A1, e WO2004049794. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb è maturato per affinità.

In alcune forme di realizzazione, i domini V_HH naturalmente presenti contro un particolare antigene o target possono essere ottenuti da librerie (naïve o immuni) di sequenze V_HH di camelidi. Tali metodi possono prevedere o meno lo screening di tale libreria con detto antigene o target, o almeno una parte, un frammento, un determinante antigenico o un epitopo dello stesso, utilizzando una o più tecniche di screening di per sé note. Tali librerie e tecniche sono descritte ad esempio in WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 e WO 03/035694. In alternativa, possono essere utilizzate librerie sintetiche o semisintetiche migliorate derivate da librerie V_HH (naïve o immuni), come ad esempio librerie V_HH ottenute da librerie V_HH (naïve o immuni) mediante tecniche quali la mutagenesi casuale e/o lo shuffling CDR, come descritto ad esempio in WO 00/43507.

Anticorpi a dominio singolo possono essere generati da anticorpi convenzionali a quattro catene. Vedere, ad esempio, EP 0 368 684, Ward et al. (Nature 12 ott. 1989; 341 (6242): 544-6), Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; WO 06/030220; e WO 06/003388.

2. Antigeni

L'uno o più antigeni target dei CAR della presente invenzione sono molecole della superficie cellulare. Gli anticorpi a dominio singolo possono essere scelti per riconoscere un antigene che agisce come marcatore della superficie cellulare su cellule target associate a un particolare stato patologico. In alcune forme di realizzazione, l'antigene (come il primo antigene e/o il secondo antigene) è un antigene tumorale. In alcune forme di realizzazione, i CAR multispecifici hanno come target due o più antigeni tumorali. In alcune forme di realizzazione, l'antigene tumorale è associato a una neoplasia delle cellule B. I tumori esprimono una serie di proteine che possono fungere da antigeni target per una risposta immunitaria, in particolare per le risposte immunitarie mediate da cellule T. Gli antigeni target del CAR possono essere antigeni di una singola cellula malata o antigeni espressi su diverse cellule che contribuiscono alla malattia. Gli antigeni target dei CAR possono essere direttamente o indirettamente coinvolti nelle malattie.

Gli antigeni tumorali sono proteine prodotte dalle cellule tumorali in grado di suscitare una risposta immunitaria, in particolare le risposte immunitarie mediate dalle cellule T. La scelta dell'antigene target dell'invenzione dipende dal tipo di tumore da trattare. Esempi di antigeni tumorali sono, ad esempio, un antigene associato al glioma, l'antigene carcinoembrionario (CEA), la gonadotropina corionica umana β , l'alfafetoproteina (AFP), l'AFP reattiva alle lectine, la tireoglobulina, RAGE-1, MN-CAIX, la telomerasi umana trascrittasi inversa, RU1, RU2 (AS), la carbossil esterasi intestinale, mut hsp70-2, M-CSF, prostasi, antigene prostatico specifico (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prosteina, PSMA, HER2/neu, survivin e telomerasi, antigene tumorale del carcinoma prostatico-1 (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasi neutrofila, ephrinB2, CD22, fattore di crescita insulinico (IGF)-I, IGF-II, recettore IGF-I e mesotelina.

In alcune forme di realizzazione, l'antigene tumorale comprende uno o più epitopi antigenici del cancro associati a un tumore maligno. I tumori maligni esprimono una serie di proteine che possono fungere da antigeni target per un attacco immunitario. Queste molecole includono, ma non solo, antigeni tessuto-specifici come MART-1, tirosinasi e gp100 nel melanoma e la fosfatasi acida prostatica (PAP) e l'antigene prostatico specifico (PSA) nel cancro alla prostata. Altre molecole target appartengono al gruppo delle molecole legate alla trasformazione, come l'oncogene HER2/Neu/ErbB-2. Un altro gruppo di antigeni target sono gli antigeni onco-fetali, come l'antigene carcinoembrionale (CEA). Nel linfoma a cellule B l'immunoglobulina idiotipo specifica per il tumore costituisce un antigene immunoglobulinico veramente specifico per il tumore. Gli antigeni di differenziazione delle cellule B, come il CD 19, il CD20 e il CD37, sono altri candidati come antigeni target nel linfoma a cellule B.

In alcune forme di realizzazione, l'antigene tumorale è un antigene tumore-specifico (TSA) o un antigene associato al tumore (TAA). Un TSA è unico per le cellule tumorali e non si verifica su altre cellule del corpo. Un antigene associato ai TAA non è esclusivo di una cellula tumorale, ma viene espresso anche su una cellula normale in condizioni che non inducono uno stato di tolleranza immunologica verso l'antigene. L'espressione dell'antigene sul tumore può avvenire in condizioni che consentono al sistema immunitario di rispondere all'antigene. I TAA possono essere antigeni

espressi sulle cellule normali durante lo sviluppo fetale, quando il sistema immunitario è immaturo e non è in grado di rispondere, oppure possono essere antigeni normalmente presenti a livelli estremamente bassi sulle cellule normali, ma espressi a livelli molto più alti sulle cellule tumorali.

Esempi non limitanti di antigeni TSA o TAA includono i seguenti: Antigeni di differenziazione come MART-1/MelanA (MART-I), gp 100 (Pmel 17), tirosinasi, TRP-1, TRP-2 e antigeni multilineari specifici del tumore come MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antigeni embrionali sovraespressi come CEA; oncogeni sovraespressi e geni soppressori mutati, come p53, Ras, HER2/neu; antigeni tumorali unici derivanti da traslocazioni cromosomiche, come BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; e antigeni virali, come gli antigeni EBVA del virus di Epstein Barr e gli antigeni E6 ed E7 del papillomavirus umano (HPV). Altri antigeni proteici di grandi dimensioni includono TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, pl85erbB2, pl80erbB-3, c-met, nm-23HI, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteina, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\PI, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS 1, SDCCAG16, proteina legante TA-90\Mac-2\proteina associata alla ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP e TPS.

In alcune forme di realizzazione, l'antigene (come il primo antigene e/o il secondo antigene) è selezionato dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77.

3. Leganti peptidici

I vari anticorpi a dominio singolo dei CAR multispecifici o multivalenti qui descritti possono essere fusi tra loro tramite linker peptidici. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi a dominio singolo sono fusi direttamente tra loro senza legami peptidici. I linker peptidici che collegano i diversi anticorpi a dominio singolo possono essere uguali o diversi. I diversi domini dei CAR possono anche essere fusi tra loro tramite linker peptidici.

Ciascun linker peptidico in un CAR può avere una lunghezza e/o una sequenza uguale o diversa a seconda delle caratteristiche strutturali e/o funzionali degli anticorpi a dominio singolo e/o dei vari domini. Ciascun linker peptidico può essere selezionato e ottimizzato in modo indipendente. La lunghezza, il grado di flessibilità e/o altre proprietà dei leganti peptidici utilizzati nei CAR possono avere una certa influenza sulle proprietà, incluse, ma non solo, l'affinità, la specificità o l'avidità per uno o più particolari antigeni o epitopi. Ad esempio, possono essere selezionati leganti peptidici più lunghi per garantire che due domini adiacenti non interferiscano stericamente l'uno con l'altro. Ad esempio, in un CAR multivalente o multispecifico della presente invenzione che comprende anticorpi a dominio singolo diretti contro un antigene multimerico, la lunghezza e la flessibilità dei legami peptidici sono preferibilmente tali da consentire a ciascun anticorpo a dominio singolo del CAR multivalente di legarsi al determinante antigenico su ciascuna delle subunità del multimerico. In alcune forme di realizzazione, un breve linker peptidico può essere disposto tra

il dominio transmembrana e il dominio di segnalazione intracellulare di un CAR. In alcune forme di realizzazione, un linker peptidico comprende residui flessibili (come glicina e serina) in modo che i domini adiacenti siano liberi di muoversi l'uno rispetto all'altro. Ad esempio, una doppietta glicina-serina può essere un legante peptidico adatto.

Il linker peptidico può essere di qualsiasi lunghezza adeguata. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico ha una lunghezza di almeno 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 o più amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico ha una lunghezza massima di 100, 75, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o meno amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, la lunghezza del legante peptidico è compresa tra circa 1 amminoacido e circa 10 amminoacidi, circa 1 amminoacido e circa 20 amminoacidi, circa 1 amminoacido e circa 30 amminoacidi, circa 5 amminoacidi e circa 15 amminoacidi, circa 10 amminoacidi e circa 25 amminoacidi, circa 5 amminoacidi e circa 30 amminoacidi, circa 10 amminoacidi e circa 30 amminoacidi, circa 30 amminoacidi e circa 50 amminoacidi, circa 50 amminoacidi e circa 100 amminoacidi, o circa 1 amminoacido e circa 100 amminoacidi.

Il linker peptidico può avere una sequenza presente in natura o una sequenza non presente in natura. Ad esempio, come linker può essere utilizzata una sequenza derivata dalla regione cerniera degli anticorpi della sola catena pesante. *Vedere*, ad esempio, WO1996/34103. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico è un linker flessibile. Esempi di leganti flessibili sono i polimeri di glicina (G)_n, i polimeri di glicina-serina (compresi, ad esempio, (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGS)_n, e (GGGGS)_n, dove n è un numero intero di almeno uno), i polimeri di glicina-alanina, i polimeri di alanina-serina e altri leganti flessibili noti nella tecnica. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico comprende la sequenza amminoacidica GGGGS (SEQ ID NO: 144), (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 145), (GGGS)₄ (SEQ ID NO: 146), GGGGSGGGGSGGGGGGSGSGGGGS (SEQ ID NO: 147), GGGGSGGGGSGGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 148), (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 149), (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 150), o (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 151).

Dominio transmembrana

I CAR della presente invenzione comprendono un dominio transmembrana che può essere fuso direttamente o indirettamente con il dominio extracellulare di legame con l'antigene. Il dominio transmembrana può essere derivato da una fonte naturale o sintetica. Come usato qui, un "dominio transmembrana" si riferisce a qualsiasi struttura proteica termodinamicamente stabile in una membrana cellulare, preferibilmente una membrana cellulare eucariotica. I domini transmembrana compatibili con l'uso nei CAR qui descritti possono essere ottenuti da una proteina presente in natura. In alternativa, può essere un segmento proteico sintetico, non presente in natura, *ad esempio* un segmento proteico idrofobico termodinamicamente stabile in una membrana cellulare.

I domini transmembrana sono classificati in base alla struttura tridimensionale del dominio transmembrana. Ad esempio, i domini transmembrana possono formare un'alfa-elica, un complesso di più alfa-eliche, un beta-barile o qualsiasi altra struttura stabile in grado di attraversare il doppio strato fosfolipidico di una cellula. Inoltre, i domini transmembrana possono essere classificati anche o in alternativa in base alla topologia del dominio transmembrana, compreso il numero di passaggi che il dominio transmembrana fa attraverso la membrana e l'orientamento della proteina. Ad esempio, le proteine di membrana a singolo passaggio attraversano la membrana cellulare una volta, mentre le proteine di membrana a più passaggi attraversano la membrana cellulare almeno due volte (*ad esempio*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o più volte). Le proteine di membrana possono essere definite di tipo I, II o III a seconda della topologia dei loro terminali e dei segmenti di passaggio della membrana rispetto all'interno e all'esterno della cellula. Le proteine di membrana di tipo I hanno una singola regione che attraversa la membrana e sono orientate in modo tale che il terminale N della proteina sia presente sul lato extracellulare del doppio strato lipidico della cellula e il terminale C della proteina sia presente sul lato citoplasmatico. Anche le proteine di membrana di tipo II hanno una singola regione che attraversa la membrana, ma sono orientate in modo tale che il terminale C della proteina sia presente sul lato extracellulare del doppio strato lipidico della cellula e il terminale N della proteina sia presente sul lato citoplasmatico. Le proteine di membrana di tipo III hanno segmenti multipli che attraversano la membrana e possono essere ulteriormente sottoclassificate in base al numero di segmenti transmembrana e alla posizione dei terminali N e C.

In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana del CAR qui descritti deriva da una proteina di membrana di tipo I a passaggio singolo. In alcune forme di realizzazione, anche i domini transmembrana di proteine di membrana multi-pass possono essere compatibili con i CAR qui descritti. Le proteine di membrana a più passaggi possono comprendere un complesso (almeno 2, 3, 4, 5, 6, 7 o più) di eliche alfa o una struttura a fogli beta. Preferibilmente, il terminale N e il terminale C di una proteina di membrana multi-pass sono presenti su lati opposti del doppio strato lipidico, *ad esempio*, il terminale N della proteina è presente sul lato citoplasmatico del doppio strato lipidico e il terminale C della proteina è presente sul lato extracellulare.

In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana del CAR comprende un dominio transmembrana scelto tra il dominio transmembrana di una catena alfa, beta o zeta di un recettore delle cellule T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRFI), CD160, CD19, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R a, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI ld, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI la, LFA-1, ITGAM, CDI lb, ITGAX, CDI lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55),

PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D e/o NKG2C. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è derivato da una molecola selezionata dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1.

In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è derivato da CD28. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è un dominio transmembrana di CD28 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 133. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana del CD28 è codificato dalla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 135.

In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è derivato da CD8 α . In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è un dominio transmembrana di CD8 α che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 132. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana del CD8 α è codificato dalla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 134.

I domini transmembrana da utilizzare nei CAR qui descritti possono anche comprendere almeno una parte di un segmento proteico sintetico non presente in natura. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è un'alfa-elica o un foglio beta sintetico, non presente in natura. In alcune forme di realizzazione, il segmento proteico è costituito da almeno 20 amminoacidi circa, *ad esempio* almeno 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o più amminoacidi. Esempi di domini transmembrana sintetici sono noti nella tecnica, ad esempio nel Brevetto U.S. n. 7,052,906 B1 e nella Pubblicazione PCT n. WO 2000/032776 A2.

Il dominio transmembrana può comprendere una regione transmembrana e una regione citoplasmatica localizzata sul lato terminale C del dominio transmembrana. La regione citoplasmatica del dominio transmembrana può comprendere tre o più amminoacidi e, in alcuni casi, contribuisce a orientare il dominio transmembrana nel doppio strato lipidico. In alcune forme di realizzazione, uno o più residui di cisteina sono presenti nella regione transmembrana del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, uno o più residui di cisteina sono presenti nella regione citoplasmatica del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, la regione citoplasmatica del dominio transmembrana comprende amminoacidi con carica positiva. In alcune forme di realizzazione, la regione citoplasmatica del dominio transmembrana comprende gli amminoacidi arginina, serina e lisina.

In alcune forme di realizzazione, la regione transmembrana del dominio transmembrana comprende residui amminoacidici idrofobici. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana della RCA comprende una sequenza idrofobica artificiale. Ad esempio, una tripletta di fenilalanina, triptofano e valina può essere presente all'estremità C del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, la regione transmembrana comprende residui amminoacidici prevalentemente idrofobici, come alanina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano o valina. In alcune

forme di realizzazione, la regione transmembrana è idrofobica. In alcune forme di realizzazione, la regione transmembrana comprende una sequenza poli-leucina-alanina. L'idropatia, o le caratteristiche idrofobiche o idrofile di una proteina o di un segmento proteico, possono essere valutate con qualsiasi metodo noto nella tecnica, ad esempio l'analisi dell'idropatia di Kyte e Doolittle.

Dominio di segnalazione intracellulare

I CAR della presente invenzione comprendono un dominio di segnalazione intracellulare. Il dominio di segnalazione intracellulare è responsabile dell'attivazione di almeno una delle normali funzioni effettrici della cellula effettrice immunitaria che esprime i CAR. Il termine "funzione effettrice" si riferisce a una funzione specializzata di una cellula. La funzione effettrice di una cellula T, ad esempio, può essere l'attività citolitica o l'attività helper, compresa la secrezione di citochine. Pertanto, il termine "dominio di segnalazione citoplasmatica" si riferisce alla porzione di una proteina che trasduce il segnale della funzione effettrice e dirige la cellula a svolgere una funzione specializzata. Sebbene di solito sia possibile utilizzare l'intero dominio di segnalazione citoplasmatica, in molti casi non è necessario utilizzare l'intera catena. Nella misura in cui viene utilizzata una porzione tronca del dominio di segnalazione citoplasmatica, tale porzione tronca può essere utilizzata al posto della catena intatta, purché trasduca il segnale della funzione effettrice. Il termine dominio di segnalazione citoplasmatica si riferisce quindi a qualsiasi porzione troncata del dominio di segnalazione citoplasmatica sufficiente a trasdurre il segnale della funzione effettrice.

In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria. In alcune forme di realizzazione, il CAR comprende un dominio di segnalazione intracellulare costituito essenzialmente da un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria. Con "dominio di segnalazione intracellulare primario" si intende una sequenza di segnalazione citoplasmatica che agisce in modo stimolante per indurre funzioni effettrici immunitarie. In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare contiene un motivo di segnalazione noto come motivo di attivazione basato su tirosina immunorecettoriale, o ITAM. Un "ITAM", come qui utilizzato, è un motivo proteico conservato che è generalmente presente nella porzione di coda delle molecole di segnalazione espresse in molte cellule immunitarie. Il motivo può comprendere due ripetizioni della sequenza amminoacidica YxxL/I separate da 6-8 amminoacidi, dove ogni x è indipendentemente un qualsiasi amminoacido, producendo il motivo conservato YxxL/Ix(6-8)YxxL/I. Gli ITAM all'interno delle molecole di segnalazione sono importanti per la trasduzione del segnale all'interno della cellula, che è mediata almeno in parte dalla fosforilazione dei residui di tirosina nella ITAM in seguito all'attivazione della molecola di segnalazione. Gli ITAM possono anche funzionare come siti di aggancio per altre proteine coinvolte nelle vie di segnalazione. Esempi di sequenze di segnalazione citoplasmatica primaria contenenti ITAM sono quelle derivate da CD3 ζ , FcR gamma(FCER1G), FcR beta (Fc Epsilon Rib), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon,

CD5, CD22, CD79a, CD79b e CD66d.

In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare consiste nel dominio di segnalazione citoplasmatica di CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario è un dominio di segnalazione citoplasmatica del CD3 ζ wild-type. In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare del CD3 ζ wild-type comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 140. In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare del CD3 ζ wild-type è codificato dall'acido nucleico di SEQ ID NO: 142. In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è un mutante funzionale del dominio di segnalazione citoplasmatica di CD3 ζ contenente una o più mutazioni, come Q65K. In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare del CD3 ζ mutante comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 141. In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare del CD3 ζ mutante è codificato dall'acido nucleico di SEQ ID NO: 143.

Dominio di segnalazione co-stimolatoria

Molte cellule effettrici immunitarie richiedono una co-stimolazione, oltre alla stimolazione di un segnale specifico dell'antigene, per promuovere la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza delle cellule, nonché per attivare le funzioni effettrici della cellula. In alcune forme di realizzazione, il CAR comprende almeno un dominio di segnalazione co-stimolatoria. Il termine "dominio di segnalazione co-stimolatoria", come qui utilizzato, si riferisce ad almeno una porzione di una proteina che media la trasduzione del segnale all'interno di una cellula per indurre una risposta immunitaria come una funzione effettrice. Il dominio di segnalazione co-stimolatoria del recettore chimerico qui descritto può essere un dominio di segnalazione citoplasmatica di una proteina co-stimolatoria, che trasduce un segnale e modula le risposte mediate da cellule immunitarie, come cellule T, cellule NK, macrofagi, neutrofilo o eosinofili. Il "dominio di segnalazione co-stimolatoria" può essere la porzione citoplasmatica di una molecola co-stimolatoria. Il termine "molecola co-stimolatoria" si riferisce a un partner di legame cognato su una cellula immunitaria (come una cellula T) che si lega specificamente a un ligando co-stimolatorio, mediando così una risposta co-stimolatoria da parte della cellula immunitaria, come ad esempio, ma non solo, la proliferazione e la sopravvivenza.

In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio singolo di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende due o più (ad esempio circa 2, 3, 4 o più) domini di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende due o più degli stessi domini di segnalazione co-stimolatoria, ad esempio due copie del dominio di segnalazione co-stimolatoria del CD28. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione

intracellulare comprende due o più domini di segnalazione co-stimolatoria di diverse proteine co-stimolatorie, come ad esempio due o più proteine co-stimolatorie qui descritte. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario (come il dominio di segnalazione citoplasmatica di CD3 ζ) e uno o più domini di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, uno o più domini di segnalazione co-stimolatoria e il dominio di segnalazione intracellulare primario (come il dominio di segnalazione citoplasmatica di CD3 ζ) sono fusi l'uno all'altro tramite linker peptidici facoltativi. Il dominio di segnalazione intracellulare primario e uno o più domini di segnalazione co-stimolatoria possono essere disposti in qualsiasi ordine. In alcune forme di realizzazione, uno o più domini di segnalazione co-stimolatoria sono localizzati tra il dominio transmembrana e il dominio di segnalazione intracellulare primario (come il dominio di segnalazione citoplasmatica del CD3 ζ). Più domini di segnalazione co-stimolatoria possono fornire effetti stimolatori additivi o sinergici.

L'attivazione di un dominio di segnalazione co-stimolatoria in una cellula ospite (*ad esempio*, una cellula immunitaria) può indurre la cellula ad aumentare o diminuire la produzione e la secrezione di citochine, le proprietà fagocitiche, la proliferazione, la differenziazione, la sopravvivenza e/o la citotossicità. Il dominio di segnalazione co-stimolatoria di qualsiasi molecola co-stimolatoria può essere compatibile per l'uso nei CAR qui descritti. Il tipo di dominio di segnalazione co-stimolatoria viene selezionato in base a fattori quali il tipo di cellule effettrici immunitarie in cui le molecole effettrici verrebbero espresse (*ad esempio*, cellule T, cellule NK, macrofagi, neutrofili o eosinofili) e la funzione effettrice immunitaria desiderata (*ad esempio*, effetto ADCC). Esempi di domini di segnalazione co-stimolatoria da utilizzare nei CAR possono essere il dominio di segnalazione citoplasmatica di proteine co-stimolatorie, tra cui, senza limitazioni, i membri della famiglia B7/CD28 (*ad esempio*, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2/B7-DC e PDCD6); membri della superfamiglia TNF (*ad es.*, 4-1BB/TNFSF9/CD137, ligando 4-1BB/TNFSF9, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFF R/TNFRSF13C, CD27/TNFRSF7, ligando CD27/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, ligando CD30/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, CD40/TNFSF5, ligando CD40/TNFSF5, DR3/TNFRSF25, GITR/TNFRSF18, GITR ligando/TNFSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, Linfotossina alfa/TNF-beta, OX40/TNFRSF4, OX40 Ligando/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNF-alpha e TNF RII/TNFRSF1B); membri della famiglia SLAM (*ad esempio*, 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6 e SLAM/CD150); e qualsiasi altra molecola co-stimolatoria, come CD2, CD7, CD53, CD82/Kai-1, CD90/Thy1, CD96, CD160, CD200, CD300a/LMIR1, HLA di classe I, HLA-DR, Ikaros, Integrina alfa 4/CD49d, Integrina alfa 4 beta 1, Integrina alfa 4 beta 7/LPAM-1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP12, Dectina-1/CLEC7A, DPPIV/CD26, EphB6, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TSLP, TSLP R, antigene associato alla funzione linfocitaria-1 (LFA-1), e NKG2C.

In alcune forme di realizzazione, uno o più domini di segnalazione co-stimolatoria sono selezionati dal gruppo costituito da CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, CD3, antigene associato alla funzione linfocitaria-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 e ligandi che si legano in particolare a CD83.

In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare del CAR di presente invenzione comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD28. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione citoplasmatica di CD3 ζ e un dominio di segnalazione co-stimolatoria di CD28. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria del CD28 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 136. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria del CD28 è codificato dalla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 138. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare è codificato dalla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 228.

In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare del CAR di presente invenzione comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137(*vale a dire* 4-1BB). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione citoplasmatica di CD3 ζ e un dominio di segnalazione co-stimolatoria di CD137. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria del CD137 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 137. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria del CD137 è codificato dalla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 139.

In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare del CAR della presente invenzione comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria di CD28 e un dominio di segnalazione co-stimolatoria di CD137. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione citoplasmatica di CD3 ζ , un dominio di segnalazione co-stimolatoria di CD28 e un dominio di segnalazione co-stimolatoria di CD137. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un polipeptide che comprende dal terminale N al terminale C: un dominio di segnalazione co-stimolatoria di CD28, un dominio di segnalazione co-stimolatoria di CD137 e un dominio di segnalazione citoplasmatica di CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria del CD28 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 136. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria del CD28 è codificato dalla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 138. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria del CD137 che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 137. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria del CD137 è codificato dalla

sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 139.

Rientrano nell'ambito della presente divulgazione anche le varianti di uno qualsiasi dei domini di segnalazione co-stimolatoria qui descritti, in modo tale che il dominio di segnalazione co-stimolatoria sia in grado di modulare la risposta immunitaria della cellula immunitaria. In alcune forme di realizzazione, i domini di segnalazione co-stimolatoria comprendono fino a 10 variazioni di residui amminoacidici (*ad esempio*, 1, 2, 3, 4, 5 o 8) rispetto alla controparte wild-type. Tali domini di segnalazione co-stimolatoria che comprendono una o più variazioni amminoacidiche possono essere definiti varianti. La mutazione di residui amminoacidici del dominio di segnalazione co-stimolatoria può determinare un aumento della trasduzione del segnale e una maggiore stimolazione delle risposte immunitarie rispetto ai domini di segnalazione co-stimolatoria che non presentano la mutazione. La mutazione di residui amminoacidici del dominio di segnalazione co-stimolatoria può determinare una diminuzione della trasduzione del segnale e una ridotta stimolazione delle risposte immunitarie rispetto ai domini di segnalazione co-stimolatoria che non presentano la mutazione.

Regione cerniera

I CAR della presente invenzione possono comprendere un dominio cerniera localizzato tra il dominio extracellulare di legame con l'antigene e il dominio transmembrana. Un dominio cerniera è un segmento amminoacidico che si trova generalmente tra due domini di una proteina e può consentire la flessibilità della proteina e il movimento di uno o entrambi i domini l'uno rispetto all'altro. È possibile utilizzare qualsiasi sequenza amminoacidica che garantisca tale flessibilità e movimento del dominio extracellulare di legame con l'antigene rispetto al dominio transmembrana della molecola effettrice.

Il dominio cerniera può contenere circa 10-100 amminoacidi, *ad esempio* circa uno tra 15-75 amminoacidi, 20-50 amminoacidi o 30-60 amminoacidi.

In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera può essere lungo almeno 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 o 75 amminoacidi.

In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera è un dominio cerniera di una proteina naturale. I domini cerniera di qualsiasi proteina nota nella tecnica per comprendere un dominio cerniera sono compatibili per l'uso nei recettori chimerici qui descritti. In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera è almeno una parte di un dominio cerniera di una proteina presente in natura e conferisce flessibilità al recettore chimerico. In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera è derivato da CD8 α . In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera è una porzione del dominio cerniera di CD8 α , *ad esempio* un frammento contenente almeno 15 (*ad esempio* 20, 25, 30, 35 o 40) amminoacidi consecutivi del dominio cerniera di CD8 α . In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera di CD8 α comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 130. In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera di CD8 α è codificato dalla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 131.

Anche i domini cerniera degli anticorpi, come gli anticorpi IgG, IgA, IgM, IgE o IgD, sono compatibili con l'uso nei sistemi recettoriali chimerici pH-dipendenti qui descritti. In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera è il dominio cerniera che unisce i domini costanti CH1 e CH2 di un anticorpo. In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera è di un anticorpo e comprende il dominio cerniera dell'anticorpo e una o più regioni costanti dell'anticorpo. In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera comprende il dominio cerniera di un anticorpo e la regione costante CH3 dell'anticorpo. In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera comprende il dominio cerniera di un anticorpo e le regioni costanti CH2 e CH3 dell'anticorpo. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo è un anticorpo IgG, IgA, IgM, IgE o IgD. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo è un anticorpo IgG. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo è un anticorpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. In alcune forme di realizzazione, la regione cerniera comprende la regione cerniera e le regioni costanti CH2 e CH3 di un anticorpo IgG1. In alcune forme di realizzazione, la regione cerniera comprende la regione cerniera e la regione costante CH3 di un anticorpo IgG1.

Come domini cerniera per i recettori chimerici qui descritti possono essere utilizzati anche peptidi non presenti in natura. In alcune forme di realizzazione, il dominio cerniera tra il terminale C del dominio extracellulare legante il ligando di un recettore Fc e il terminale N del dominio transmembrana è un linker peptidico, ad esempio un linker (GxS)_n, dove x e n, indipendentemente, possono essere un numero intero compreso tra 3 e 12, inclusi 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o più.

Peptide segnale

I CAR della presente invenzione possono comprendere un peptide segnale (noto anche come sequenza segnale) al terminale N del polipeptide. In generale, i peptidi segnale sono sequenze peptidiche che indirizzano un polipeptide al sito desiderato in una cellula. In alcune forme di realizzazione, il peptide segnale indirizza la molecola effettrice alla via secretoria della cellula e consente l'integrazione e l'ancoraggio della molecola effettrice nel doppio strato lipidico. I peptidi segnale, comprese le sequenze segnale di proteine presenti in natura o le sequenze segnale sintetiche non presenti in natura, che sono compatibili per l'uso nei CAR qui descritti saranno evidenti agli esperti della tecnica. In alcune forme di realizzazione, il peptide segnale è derivato da una molecola selezionata dal gruppo costituito da CD8 α , recettore α del GM-CSF e catena pesante IgG1. In alcune forme di realizzazione, il peptide segnale è derivato da CD8 α . In alcune forme di realizzazione, il peptide segnale di CD8 α comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 127. In alcune forme di realizzazione, il peptide segnale di CD8 α è codificato dalla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 129.

IV. Cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate

Sono inoltre disponibili cellule effettrici immunitarie che comprendono uno qualsiasi dei CAR dell'invenzione.

Pertanto, in alcune forme di realizzazione, è fornita una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un recettore antigenico chimerico (CAR) multispecifico (per esempio bispecifico) dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un primo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente a un primo antigene (come un primo antigene tumorale) e un secondo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente a un secondo antigene (come un secondo antigene tumorale); (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui il primo antigene è diverso dal secondo antigene. In alcune forme di realizzazione, il primo antigene e/o il secondo antigene è selezionato dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb e/o il secondo sdAb è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, il primo anticorpo a dominio singolo e il secondo anticorpo a dominio singolo sono fusi l'uno all'altro mediante un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR multispecifico comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR multispecifico comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un primo dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28, un secondo dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N

al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è una cellula T, una cellula NK, una cellula mononucleata di sangue periferico (PBMC), una cellula staminale ematopoietica, una cellula staminale pluripotente o una cellula staminale embrionale. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogenica.

In alcune forme di realizzazione, è fornita una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un CAR BCMA \times CD38 dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA e un anticorpo a dominio singolo anti-CD38; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA e/o l'sdAb anti-CD38 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA e l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 sono fusi l'uno all'altro mediante un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA è fuso al terminale N dell'sdAb anti-CD38. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA è fuso al terminale C dell'sdAb anti-CD38. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 144-151. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA \times CD38 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA \times CD38 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α ,

un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 18 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:29. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-CD38 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:44, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:56 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:68. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA \times CD38 comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 207-216. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è una cellula T, una cellula NK, una cellula mononucleata di sangue periferico (PBMC), una cellula staminale ematopoietica, una cellula staminale pluripotente o una cellula staminale embrionale. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogena.

In alcune forme di realizzazione, è fornita una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un CAR CD19 \times CD20 dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 e un anticorpo a dominio singolo anti-CD20; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 e/o l'sdAb anti-CD20 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 e l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 sono fusi l'uno all'altro mediante un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è fuso al terminale N dell'sdAb anti-CD20. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è fuso al terminale C dell'sdAb anti-CD20. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 144-151. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 \times CD20

comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 \times CD20 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-CD20 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:4, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 5 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:6. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 \times CD20 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 206. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è una cellula T, una cellula NK, una cellula mononucleata di sangue periferico (PBMC), una cellula staminale ematopoietica, una cellula staminale pluripotente o una cellula staminale embrionale. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogenica.

In alcune forme di realizzazione, è fornita una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un CAR CD19 \times CD22 dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 e un anticorpo a dominio singolo anti-CD22; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 e/o l'sdAb anti-CD22 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD22 e l'anticorpo a dominio singolo anti-CD22 sono fusi l'uno all'altro mediante un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è fuso al terminale N dell'sdAb anti-CD22. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è fuso al terminale C dell'sdAb anti-CD22. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 144-151. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una

cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 \times CD22 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 \times CD22 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio transmembrana CD28, un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è una cellula T, una cellula NK, una cellula mononucleata di sangue periferico (PBMC), una cellula staminale ematopoietica, una cellula staminale pluripotente o una cellula staminale embrionale. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogenica.

In alcune forme di realizzazione, è fornita una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un CAR CD19 \times BCMA dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 e un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 e/o l'sdAb anti-BCMA è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA e l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA sono fusi l'uno all'altro mediante un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è fuso al terminale N dell'sdAb anti-BCMA. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è fuso al terminale C dell'sdAb anti-BCMA. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 144-151. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di

realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 \times BCMA comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 \times BCMA comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è una cellula T, una cellula NK, una cellula mononucleata di sangue periferico (PBMC), una cellula staminale ematopoietica, una cellula staminale pluripotente o una cellula staminale embrionale. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogenica.

In alcune forme di realizzazione, è fornita una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un recettore antigenico chimerico multivalente dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente una pluralità di anticorpi a dominio singolo (sdAb) che si legano specificamente a un antigene (come un antigene tumorale); (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare. In alcune forme di realizzazione, l'antigene è selezionato dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77. In alcune forme di realizzazione, la pluralità di sdAb è camelide, chimerica o umanizzata. In alcune forme di realizzazione, la

pluralità di anticorpi a dominio singolo è fusa reciprocamente tramite legami peptidici o linker peptidici. In alcune forme di realizzazione, ciascun linker peptidico ha una lunghezza massima di circa 50 (ad esempio non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente comprende inoltre un dominio cerniera (ad esempio un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente comprende inoltre un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente è monospecifico. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente è multispecifico, ad esempio bispecifico. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 198-201.

In alcune forme di realizzazione, è fornita una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un recettore antigenico chimerico multivalente dell'invenzione che comprende un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un primo anticorpo a dominio singolo che si lega specificamente a un primo epitopo di un antigene (ad esempio un antigene tumorale) e un secondo anticorpo a dominio singolo che si lega specificamente a un secondo epitopo dell'antigene; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, dove il primo epitopo e il secondo epitopo sono diversi. In alcune forme di realizzazione, l'antigene è selezionato dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb e/o il secondo sdAb sono camelidi, chimerici o umanizzati. In alcune forme di realizzazione, il primo anticorpo a dominio singolo e il secondo anticorpo a dominio singolo sono fusi l'uno all'altro tramite un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (ad esempio

non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare è un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente comprende inoltre un dominio cerniera (ad esempio un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente comprende inoltre un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è una cellula T, una cellula NK, una cellula mononucleata di sangue periferico (PBMC), una cellula staminale ematopoietica, una cellula staminale pluripotente o una cellula staminale embrionale. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogenica.

In alcune forme di realizzazione, è fornita una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un recettore antigenico chimerico CD19 dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD19; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui l'sdAb anti-CD19 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 comprende un dominio V_HH comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di

realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . Presentato come riferimento, il CAR CD19 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 248. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è una cellula T, una cellula NK, una cellula mononucleata di sangue periferico (PBMC), una cellula staminale ematopoietica, una cellula staminale pluripotente o una cellula staminale embrionale. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogena.

In alcune forme di realizzazione, è fornita una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) dell'invenzione comprendente un CAR CD20 dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD20; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui l'sdAb anti-CD20 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:4, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 5 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:6. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD20 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD20 comprende inoltre una FR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 244, una FR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 245, una FR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 246 e/o una FR4 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 247. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD20 comprende un dominio V_HH comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83

e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . Presentato come riferimento, il CAR CD20 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 249. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è una cellula T, una cellula NK, una cellula mononucleata di sangue periferico (PBMC), una cellula staminale ematopoietica, una cellula staminale pluripotente o una cellula staminale embrionale. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogena.

In alcune forme di realizzazione, viene fornita una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) che comprende un CAR BCMA dell'invenzione che comprende un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, dove l'sdAb anti-BCMA comprende uno qualsiasi di quanto segue:

(12) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:18; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:29;

(13) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:8; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:19; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:30;

(14) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:9; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:20; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:31;

(15) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:10; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:21; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:32;

(16) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:22; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:33;

(17) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:12; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:23; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:34;

(18) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:13; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:24; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:35;

(19) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:14; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:25; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:36;

(20) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:15; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:26; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:37;

(21) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:16; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:27; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:38; o

(22) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:17; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:28; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:39.

In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA è camelide, chimerico, umano o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA comprende un dominio V_HH con una sequenza amminoacidica del gruppo costituito da SEQ ID NO:78-88. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA comprende anche un dominio cerniera (ad esempio un dominio cerniera CD8α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8α, il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8α, un dominio transmembrana di CD28, un primo dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD28, un secondo dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio primario di segnalazione intracellulare derivato da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende

dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio primario di segnalazione intracellulare derivato da CD3 ζ . Divulgato come riferimento, il CAR BCMA comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 152-162. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è una cellula T, una cellula NK, una cellula mononucleata di sangue periferico (PBMC), una cellula staminale ematopoietica, una cellula staminale pluripotente o una cellula staminale embrionale. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogenica.

In alcune forme di realizzazione, è fornita una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un CAR CD38 dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD38; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui l'sdAb anti-CD38 comprende uno qualsiasi di quanto segue:

(13) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:40; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:52; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:64;

(14) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:41; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:53; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:65;

(15) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:42; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:54; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:66;

(16) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:43; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:55; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:67;

(17) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:44; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:56; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:68;

(18) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:45; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:57; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:69;

(19) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:46; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:58; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:70;

(20) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:47; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:59; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:71;

(21) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:48; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:60; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:72;

(22) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:49; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:61; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:73;

(23) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:50; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:62; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:74; o

(24) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:51; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:63; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:75.

In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD38 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD38 comprende un dominio V_HH comprendente una sequenza amminoacidica del gruppo costituito da SEQ ID NO:89-100. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8α, l'sdAb anti-CD38, un dominio cerniera CD8α, un dominio transmembrana CD28, un primo dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28, un secondo dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8α, il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8α, un dominio transmembrana CD8α, un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione

intracellulare primario derivato da CD3 ζ . Viene presentato come riferimento un CAR CD38 comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 163-174. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è una cellula T, una cellula NK, una cellula mononucleata di sangue periferico (PBMC), una cellula staminale ematopoietica, una cellula staminale pluripotente o una cellula staminale embrionale. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogena.

Sono previste anche cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate che comprendono (o esprimono) due o più CAR diversi. Due o più CAR qui descritti possono essere espressi in combinazione. I CAR possono avere come target antigeni diversi, fornendo così effetti sinergici o additivi. Poiché gli anticorpi a dominio singolo nei domini extracellulari di legame con l'antigene dei CAR hanno solo catene variabili dell'antigene singole (come le catene pesanti), tali cellule che esprimono CAR non hanno problemi di accoppiamento errato delle catene variabili, come invece accade nelle cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate che co-esprimono due o più CAR basati su scFv. Esempi di cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate che co-esprimono due CAR basati su V_HH sono illustrati nella FIGURA 1E. Un esperto della tecnica riconoscerebbe che i CAR basati su altri sAb o aventi altre strutture, come descritto nel presente documento, possono essere co-espressi anche nelle cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate. I due o più CAR possono essere codificati sullo stesso vettore o su vettori diversi.

La cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata può ulteriormente esprimere una o più proteine terapeutiche e/o immunomodulatori, come gli inibitori del checkpoint immunitario. Vedere, ad esempio, le Domande di Brevetto Internazionali n. PCT/CN2016/073489 e PCT/CN2016/087855.

Vettori

La presente invenzione fornisce vettori per il clonaggio e l'espressione di uno qualsiasi dei CAR dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, il vettore è adatto alla replicazione e all'integrazione in cellule eucariotiche, come quelle di mammifero. In alcune forme di realizzazione, il vettore è un vettore virale. Esempi di vettori virali includono, ma non solo, vettori adenovirali, vettori di virus adenoassociati, vettori lentivirali, vettori retrovirali, vettori vaccinici, vettori virali dell'herpes simplex e loro derivati. La tecnologia dei vettori virali è ben nota nella tecnica ed è descritta, ad esempio, in Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) e in altri manuali di virologia e biologia molecolare.

Sono stati sviluppati diversi sistemi basati su virus per il trasferimento di geni in cellule di mammifero. Ad esempio, i retrovirus rappresentano una comoda piattaforma per i sistemi di rilascio dei geni. L'acido nucleico eterologo può essere inserito in un vettore e confezionato in particelle retrovirali utilizzando tecniche note nella tecnica. Il virus ricombinante può quindi essere isolato e consegnato alla cellula di mammifero ingegnerizzata *in vitro* o

ex vivo. Nella tecnica sono noti diversi sistemi retrovirali. In alcune forme di realizzazione si utilizzano vettori di adenovirus. Sono noti nella tecnica diversi vettori di adenovirus. In alcune forme di realizzazione si utilizzano vettori lentivirus. In alcune forme di realizzazione si utilizzano vettori lentivirali autoinattivanti. Ad esempio, i vettori lentivirali autoinattivanti che recano la sequenza codificante dell'immunomodulatore (come l'inibitore del checkpoint immunitario) e/o i vettori lentivirali autoinattivanti che recano recettori antigenici chimerici possono essere confezionati con protocolli noti nella tecnica. I vettori lentivirali ottenuti possono essere utilizzati per trasdurre una cellula di mammifero (come le cellule T umane primarie) utilizzando metodi noti nella tecnica. I vettori derivati da retrovirus, come i lentivirus, sono strumenti adatti per ottenere il trasferimento genico a lungo termine, perché consentono l'integrazione stabile e a lungo termine di un transgene e la sua propagazione in cellule progenitrici. I vettori lentivirali hanno anche una bassa immunogenicità e possono trasdurre cellule non proliferanti.

In alcune forme di realizzazione, il vettore comprende uno qualsiasi degli acidi nucleici che codificano un CAR dell'invenzione. L'acido nucleico può essere clonato nel vettore utilizzando qualsiasi metodo di clonazione molecolare noto nella tecnica, compreso, ad esempio, l'utilizzo di siti per endonucleasi di restrizione e uno o più marcatori selezionabili. In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico è legato operativamente a un promotore. Per l'espressione genica nelle cellule di mammifero sono stati studiati diversi tipi di promotori e nella presente invenzione può essere utilizzato uno qualsiasi dei promotori noti nella tecnica. I promotori possono essere classificati grossolanamente come promotori costitutivi o regolati, come i promotori inducibili.

In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico che codifica il CAR è legato operativamente a un promotore costitutivo. I promotori costitutivi consentono di esprimere geni eterologhi (detti anche transgeni) in modo costitutivo nelle cellule ospiti. I promotori costitutivi esemplificativi qui contemplati includono, ma non sono limitati a, i promotori del citomegalovirus (CMV), il fattore di allungamento umano-1 alfa (hEF1 α), il promotore dell'ubiquitina C (UbiC), il promotore della fosfogliccherchinasi (PGK), il promotore precoce del Simian virus 40 (SV40) e il promotore della β -actina di pollo accoppiato con l'enhancer precoce del CMV (CAGG). L'efficienza di tali promotori costitutivi nel guidare l'espressione dei transgeni è stata ampiamente confrontata in un gran numero di studi. Ad esempio, Michael C. Milone *et al.* hanno confrontato l'efficienza di CMV, hEF1 α , UbiC e PGK nel guidare l'espressione del recettore antigenico chimerico in cellule T umane primarie, concludendo che il promotore hEF1 α non solo ha indotto il più alto livello di espressione del transgene, ma è stato anche mantenuto in modo ottimale nelle cellule T umane CD4 e CD8 (Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009)). In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico che codifica il CAR è legato operativamente a un promotore hEF1 α .

In alcune forme di realizzazione, l'acido nucleico che codifica il CAR è legato operativamente a un promotore inducibile. I promotori inducibili

appartengono alla categoria dei promotori regolati. Il promotore inducibile può essere indotto da una o più condizioni, come una condizione fisica, il microambiente della cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata o lo stato fisiologico della cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata, un induttore (*vale a dire* un agente induttore) o una combinazione di questi. La condizione di induzione può non indurre l'espressione di geni endogeni nella cellula di mammifero ingegnerizzata e/o nel soggetto che riceve la composizione farmaceutica. La condizione di induzione può essere selezionata dal gruppo costituito da: induttore, irradiazione (come radiazioni ionizzanti, luce), temperatura (come calore), stato redox, ambiente tumorale e stato di attivazione della cellula di mammifero ingegnerizzata.

In alcune forme di realizzazione, il vettore contiene anche un gene marcatore selezionabile o un gene reporter per selezionare le cellule che esprimono il CAR dalla popolazione di cellule ospiti trasfettate attraverso vettori lentivirali. Sia i marcatori selezionabili che i geni reporter possono essere affiancati da sequenze regolatrici appropriate per consentire l'espressione nelle cellule ospiti. Ad esempio, il vettore può contenere terminatori di trascrizione e traduzione, sequenze di iniziazione e promotori utili per regolare l'espressione delle sequenze di acido nucleico.

In alcune forme di realizzazione, il vettore comprende più di un acido nucleico che codifica i CAR. In alcune forme di realizzazione, il vettore comprende un acido nucleico che comprende una prima sequenza di acido nucleico che codifica un primo CAR e una seconda sequenza di acido nucleico che codifica un secondo CAR, in cui il primo acido nucleico è legato operativamente al secondo acido nucleico tramite una terza sequenza di acido nucleico che codifica un peptide auto-clivabile. In alcune forme di realizzazione, il peptide auto-clivabile è selezionato dal gruppo composto da T2A, P2A e F2A. In alcune forme di realizzazione, il peptide T2A ha la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 254. In alcune forme di realizzazione, il peptide T2A è codificato dalla sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 255. In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante un CAR BCMA e un CAR CD38, comprendente la sequenza di acido nucleico di SEQ ID NO: 239.

Cellule effettrici immunitarie

Le "cellule effettrici immunitarie" sono cellule immunitarie in grado di svolgere funzioni di effettore immunitario. In alcune forme di realizzazione, le cellule effettrici immunitarie esprimono almeno FcγRIII e svolgono la funzione di effettore ADCC. Esempi di cellule effettrici immunitarie che mediano l'ADCC sono le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), le cellule natural killer (NK), i monociti, le cellule T citotossiche, i neutrofili e gli eosinofili.

In alcune forme di realizzazione, le cellule effettrici del sistema immunitario sono cellule T. In alcune forme di realizzazione, le cellule T sono CD4+/CD8-, CD4-/CD8+, CD4+/CD8+, CD4-/CD8- o una loro combinazione. In alcune forme di realizzazione, le cellule T producono IL-2, TFN e/o TNF dopo aver espresso il CAR e essersi legate alle cellule target, come le cellule tumorali CD20+ o CD19+. In alcune forme di realizzazione, le

cellule T CD8+ lisano le cellule target specifiche per l'antigene dopo aver espresso il CAR e averlo legato alle cellule target.

In alcune forme di realizzazione, le cellule effettrici immunitarie sono cellule NK. In altre forme di realizzazione, le cellule effettrici immunitarie possono essere linee cellulari consolidate, ad esempio le cellule NK-92.

In alcune forme di realizzazione, le cellule effettrici immunitarie sono differenziate da una cellula staminale, come una cellula staminale ematopoietica, una cellula staminale pluripotente, una iPS o una cellula staminale embrionale.

Le cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate sono preparate introducendo i CAR nelle cellule effettrici immunitarie, come i linfociti T. Il CAR può essere introdotto nelle cellule effettrici immunitarie mediante la trasfezione di uno qualsiasi degli acidi nucleici isolati o di uno qualsiasi dei vettori descritti nella Sezione III. Il CAR può essere introdotto nelle cellule effettrici immunitarie inserendo le proteine nella membrana cellulare mentre si fanno passare le cellule attraverso un sistema microfluidico, come CELL SQUEEZE® (*vedere*, ad esempio, la Pubblicazione della Domanda di Brevetto U.S. n. 20140287509).

I metodi per introdurre vettori o acidi nucleici isolati in una cellula di mammifero sono noti nella tecnica. I vettori descritti possono essere trasferiti in una cellula effettrice immunitaria con metodi fisici, chimici o biologici.

I metodi fisici per introdurre il vettore in una cellula effettrice immunitaria includono la precipitazione con fosfato di calcio, la lipofezione, il bombardamento di particelle, la microiniezione, l'elettroporazione e simili. I metodi per la produzione di cellule contenenti vettori e/o acidi nucleici esogeni sono ben noti nella tecnica. *Vedere*, ad esempio, Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Il vettore può essere introdotto nella cellula mediante elettroporazione.

I metodi biologici per introdurre il vettore in una cellula effettrice immunitaria includono l'uso di vettori a DNA e RNA. I vettori virali sono diventati il metodo più utilizzato per l'inserimento di geni in cellule di mammifero, *ad esempio* umane.

I mezzi chimici per introdurre il vettore in una cellula effettrice immunitaria includono sistemi di dispersione colloidale, come complessi di macromolecole, nanocapsule, microsfele, perline e sistemi a base lipidica, tra cui emulsioni olio-in-acqua, micelle, micelle miste e liposomi. Un sistema colloidale esemplificativo da utilizzare come veicolo di somministrazione *in vitro* è un liposoma (*ad esempio*, una vescicola di membrana artificiale).

Le molecole di RNA che codificano uno qualsiasi dei CAR qui descritte possono essere preparate con un metodo convenzionale (*ad esempio*, la trascrizione *in vitro*) e quindi introdotte nelle cellule effettrici del sistema immunitario attraverso metodi noti come l'elettroporazione dell'mRNA. *Vedere*, *ad esempio*, Rabinovich *et al.*, *Human Gene Therapy* 17:1027-1035.

La cellula effettrice immunitaria trasdotta o trasfettata può essere propagata ex vivo dopo l'introduzione del vettore o dell'acido nucleico isolato. La cellula effettrice immunitaria trasdotta o trasfettata può essere coltivata per propagarsi per almeno 1 giorno, 2 giorni, 3 giorni, 4 giorni, 5 giorni, 6 giorni, 7 giorni, 10 giorni, 12 giorni o 14 giorni. La cellula effettrice immunitaria trasdotta o trasfettata può essere ulteriormente valutata o sottoposta a screening per selezionare la cellula di mammifero ingegnerizzata.

I geni reporter possono essere utilizzati per identificare le cellule potenzialmente trasfettate e per valutare la funzionalità delle sequenze regolatorie. In generale, un gene reporter è un gene che non è presente o espresso dall'organismo o dal tessuto ricevente e che codifica un polipeptide la cui espressione si manifesta con una proprietà facilmente rilevabile, *ad esempio* l'attività enzimatica. L'espressione del gene reporter viene analizzata in un momento opportuno dopo l'introduzione del DNA nelle cellule riceventi. I geni reporter adatti possono includere geni che codificano la luciferasi, la beta-galattosidasi, la cloramfenicolo acetil transferasi, la fosfatasi alcalina secreta o il gene della proteina verde fluorescente (*ad esempio*, U1-Tei *et al.* FEBS Letters 479: 79-82 (2000)). I sistemi di espressione adatti sono ben noti e possono essere preparati con tecniche note o ottenuti in commercio.

Altri metodi per confermare la presenza dell'acido nucleico che codifica i CAR nella cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata includono, *ad esempio*, saggi biologici molecolari ben noti a chi è esperto del settore, come Southern e Northern blotting, RT-PCR e PCR; saggi biochimici, come la rilevazione della presenza o dell'assenza di un particolare peptide, *ad esempio* con metodi immunologici (come ELISA e Western blot).

1. Fonti di cellule T (La sezione "Fonti di cellule T" è indicata come riferimento. Le forme di realizzazione riportate in questa sezione non sono forme di realizzazione dell'invenzione)

Prima dell'espansione e della modifica genetica delle cellule T, si ottiene una fonte di cellule T da un individuo. Le cellule T possono essere ottenute da diverse fonti, tra cui cellule mononucleate del sangue periferico, midollo osseo, tessuto linfonodale, sangue del cordone ombelicale, tessuto del timo, tessuto proveniente da un sito di infezione, ascite, versamento pleurico, tessuto della milza e tumori. In alcune forme di realizzazione, è possibile utilizzare un numero qualsiasi di linee di cellule T disponibili nella tecnica. In alcune forme di realizzazione, le cellule T possono essere ottenute da un'unità di sangue prelevata da un soggetto utilizzando una serie di tecniche note al tecnico esperto, come la separazione Ficoll™. In alcune forme di realizzazione, le cellule del sangue circolante di un individuo sono ottenute mediante aferesi. Il prodotto dell'aferesi contiene tipicamente linfociti, compresi i linfociti T, monociti, granulociti, cellule B, altri globuli bianchi nucleati, globuli rossi e piastrine. In alcune forme di realizzazione, le cellule raccolte mediante aferesi possono essere lavate per rimuovere la frazione plasmatica e collocare le cellule in un tampone o in un terreno appropriato per le successive fasi di lavorazione. In alcune forme di realizzazione, le cellule vengono lavate con tampone fosfato (PBS). In alcune

forme di realizzazione, la soluzione di lavaggio è priva di calcio e magnesio o di molti, se non di tutti, i cationi divalenti. Ancora una volta, sorprendentemente, le fasi iniziali di attivazione in assenza di calcio portano a un'attivazione amplificata. Come gli esperti del settore apprezzeranno facilmente, una fase di lavaggio può essere eseguita mediante metodi noti agli esperti del settore, come utilizzando una centrifuga semiautomatica "a flusso continuo" (ad esempio, il processore a celle Cobe 2991, il Baxter CytoMate o l'Haemonetics Cell Saver 5) secondo le istruzioni del produttore. Dopo il lavaggio, le cellule possono essere risospese in una varietà di tamponi biocompatibili, come, ad esempio, PBS senza Ca^{2+} , Mg^{2+} , PlasmaLyte A, o altra soluzione salina con o senza tampone. In alternativa, i componenti indesiderati del campione di aferesi possono essere rimossi e le cellule direttamente risospese nel terreno di coltura.

In alcune forme di realizzazione, i linfociti T vengono isolati dai linfociti del sangue periferico lisando i globuli rossi ed eliminando i monociti, ad esempio mediante centrifugazione attraverso un gradiente PERCOLL™ o mediante elutriazione centrifuga in controcorrente. Una specifica sottopopolazione di cellule T, come le cellule CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ e CD45RO+T, può essere ulteriormente isolata mediante tecniche di selezione positiva o negativa. Ad esempio, in alcune forme di realizzazione, le cellule T vengono isolate mediante incubazione con microsfere coniugate con anti-CD3/anti-CD28 (vale a dire 3×28), come DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, per un periodo di tempo sufficiente alla selezione positiva delle cellule T desiderate. In alcune forme di realizzazione, il periodo di tempo è di circa 30 minuti. In un'ulteriore forma di realizzazione, il periodo di tempo varia da 30 minuti a 36 ore o più e tutti i valori interi compresi tra questi. In un'ulteriore forma di realizzazione, il periodo di tempo è di almeno 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ore. In alcune forme di realizzazione, il periodo di tempo va da 10 a 24 ore. In alcune forme di realizzazione, il periodo di incubazione è di 24 ore. Per l'isolamento di cellule T da pazienti con leucemia, l'uso di tempi di incubazione più lunghi, come 24 ore, può aumentare la resa cellulare. Tempi di incubazione più lunghi possono essere utilizzati per isolare le cellule T in qualsiasi situazione in cui vi siano poche cellule T rispetto ad altri tipi di cellule, ad esempio per isolare i linfociti infiltranti il tumore (TIL) dal tessuto tumorale o da individui immunocompromessi. Inoltre, l'uso di tempi di incubazione più lunghi può aumentare l'efficienza della cattura delle cellule T CD8+. Pertanto, semplicemente accorciando o allungando il tempo in cui le cellule T possono legarsi alle microsfere CD3/CD28 e/o aumentando o diminuendo il rapporto tra microsfere e cellule T (come descritto più avanti), è possibile selezionare in modo preferenziale sottopopolazioni di cellule T all'inizio della coltura o in altri momenti del processo. Inoltre, aumentando o diminuendo il rapporto di anticorpi anti-CD3 e/o anti-CD28 sulle microsfere o su altre superfici, è possibile selezionare in modo preferenziale sottopopolazioni di cellule T all'inizio della coltura o in altri momenti desiderati. L'esperto della tecnica riconosce che è possibile utilizzare anche più turni di selezione. In alcune forme di realizzazione, può essere auspicabile eseguire la procedura di selezione e utilizzare le cellule "non selezionate" nel processo di attivazione ed espansione. Le cellule "non

selezionate" possono essere sottoposte a ulteriori cicli di selezione.

L'arricchimento di una popolazione di cellule T mediante selezione negativa può essere ottenuto con una combinazione di anticorpi diretti verso marcatori di superficie unici delle cellule selezionate negativamente. Un metodo è l'ordinamento e/o la selezione cellulare mediante immunoaderenza magnetica negativa o citometria a flusso che utilizza un cocktail di anticorpi monoclonali diretti verso i marcatori della superficie cellulare presenti sulle cellule selezionate negativamente. Ad esempio, per arricchire le cellule CD4+ mediante selezione negativa, un cocktail di anticorpi monoclonali include tipicamente anticorpi contro CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR e CD8. In alcune forme di realizzazione, può essere auspicabile arricchire o selezionare positivamente le cellule T regolatorie che tipicamente esprimono CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+ e FoxP3+. In alternativa, in alcune forme di realizzazione, le cellule T regolatorie vengono depauperate mediante microsfele coniugate con anti-CD25 o altri metodi di selezione simili. Per l'isolamento di una popolazione desiderata di cellule mediante selezione positiva o negativa, è possibile variare la concentrazione di cellule e la superficie (*ad esempio*, particelle come le microsfele). In alcune forme di realizzazione, può essere auspicabile ridurre significativamente il volume in cui le microsfele e le cellule sono mescolate insieme (vale a dire, aumentare la concentrazione di cellule), per garantire il massimo contatto tra cellule e microsfele. Ad esempio, in una forma di realizzazione si utilizza una concentrazione di 2 miliardi di cellule/ml. In una forma di realizzazione, si utilizza una concentrazione di 1 miliardo di cellule/ml. In un'ulteriore forma di realizzazione, si utilizzano più di 100 milioni di cellule/ml. In un'ulteriore forma di realizzazione, si utilizza una concentrazione di cellule di 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 milioni di cellule/ml. In un'altra forma di realizzazione, si utilizza una concentrazione di cellule compresa tra 75, 80, 85, 90, 95 o 100 milioni di cellule/ml. In ulteriori forme di realizzazione, si possono utilizzare concentrazioni di 125 o 150 milioni di cellule/ml. L'uso di concentrazioni elevate può aumentare la resa cellulare, l'attivazione e l'espansione delle cellule. Inoltre, l'uso di alte concentrazioni cellulari consente una cattura più efficiente di cellule che possono esprimere debolmente gli antigeni target di interesse, come le cellule T CD28-negative, o da campioni in cui sono presenti molte cellule tumorali (*ad esempio*, sangue leucemico, tessuto tumorale, eccetera). Tali popolazioni di cellule possono avere un valore terapeutico e sarebbe auspicabile ottenerle. Ad esempio, l'utilizzo di un'alta concentrazione di cellule consente una selezione più efficiente delle cellule T CD8+ che normalmente hanno un'espressione CD28 più debole.

In alcune forme di realizzazione, può essere auspicabile utilizzare concentrazioni inferiori di cellule. Diluendo in modo significativo la miscela di cellule T e superficie (*ad esempio*, particelle come le perle), si riducono al minimo le interazioni tra le particelle e le cellule. In questo modo si selezionano le cellule che esprimono elevate quantità di antigeni desiderati da legare alle particelle. Ad esempio, le cellule T CD4+ esprimono livelli più elevati di CD28 e sono catturate più efficacemente delle cellule T CD8+ in concentrazioni diluite. In alcune forme di realizzazione, la

concentrazione di cellule utilizzate è di 5×10^6 /ml. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione utilizzata può essere compresa tra 1×10^5 /ml e 1×10^6 /ml, e qualsiasi valore intero intermedio.

In alcune forme di realizzazione, le cellule possono essere incubate su un rotatore per un periodo di tempo variabile a velocità variabili a $2-10^\circ\text{C}$ o a temperatura ambiente.

Le cellule T per la stimolazione possono anche essere congelate dopo una fase di lavaggio. Non volendo essere vincolati dalla teoria, la fase di congelamento e successivo scongelamento fornisce un prodotto più uniforme eliminando i granulociti e, in parte, i monociti dalla popolazione cellulare. Dopo la fase di lavaggio che rimuove il plasma e le piastrine, le cellule possono essere sospese in una soluzione di congelamento. Mentre molte soluzioni e parametri di congelamento sono noti nella tecnica e saranno utili in questo contesto, un metodo prevede l'utilizzo di PBS contenente il 20% di DMSO e l'8% di sieroalbumina umana, o di terreni di coltura contenenti il 10% di destrano 40 e il 5% di destrosio, il 20% di sieroalbumina umana e il 7,5% di DMSO, o il 31,25% di Plasmalyte-A, il 31,25% destrosio 5%, 0,45% NaCl, 10% destrano 40 e 5% destrosio, 20% sieroalbumina umana e 7,5% DMSO o altri terreni di coltura idonei per il congelamento delle cellule contenenti, ad esempio, Hespan e PlasmaLyte A; le cellule vengono quindi congelate a -80°C a una velocità di 1° al minuto e conservate nella fase vapore di un serbatoio di azoto liquido. Si possono utilizzare altri metodi di congelamento controllato o congelamento non controllato immediatamente a -20°C o in azoto liquido.

In alcune forme di realizzazione, le cellule crioconservate vengono scongelate e lavate come descritto nel presente documento e lasciate riposare per un'ora a temperatura ambiente prima dell'attivazione.

È inoltre indicato come riferimento il prelievo di campioni di sangue o di prodotti di aferesi da un soggetto in un periodo precedente a quello in cui potrebbero essere necessarie le cellule espanse descritte nel presente documento. In questo modo, la fonte delle cellule da espandere può essere raccolta in qualsiasi momento e le cellule desiderate, come le cellule T, possono essere isolate e congelate per essere successivamente utilizzate nella terapia con cellule T per qualsiasi malattia o condizione che possa trarre beneficio dalla terapia con cellule T, come quelle descritte nel presente documento. In una forma di realizzazione, un campione di sangue o un'afèresi viene prelevato da un soggetto generalmente sano. In alcune forme di realizzazione, un campione di sangue o un'afèresi viene prelevato da un soggetto generalmente sano che è a rischio di sviluppare una malattia, ma che non ha ancora sviluppato una malattia, e le cellule di interesse vengono isolate e congelate per un uso successivo. In alcune forme di realizzazione, le cellule T possono essere espanse, congelate e utilizzate in un secondo momento. In alcune forme di realizzazione, i campioni vengono raccolti da un paziente poco dopo la diagnosi di una particolare malattia, come descritto nel presente documento, ma prima di qualsiasi trattamento. In un'ulteriore

forma di realizzazione, le cellule sono isolate da un campione di sangue o da un'aferesi di un soggetto prima di una serie di modalità di trattamento pertinenti, tra cui, ma non solo, il trattamento con agenti come natalizumab, efalizumab, agenti antivirali, chemioterapia, radiazioni, agenti immunosoppressivi, come ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato e FK506, anticorpi o altri agenti immunoablativi come CAMPATH, anticorpi anti-CD3, citoxan, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, acido micofenolico, steroidi, FR901228 e irradiazione. Questi farmaci inibiscono la fosfatasi calcio-dipendente calcineurina (ciclosporina e FK506) o inibiscono la chinasi p70S6, importante per la segnalazione indotta dai fattori di crescita (rapamicina) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). In un'ulteriore forma di realizzazione, le cellule sono isolate per un paziente e congelate per un uso successivo in concomitanza con (*ad esempio*, prima, contemporaneamente o dopo) il trapianto di midollo osseo o di cellule staminali, la terapia ablativa delle cellule T utilizzando agenti chemioterapici come la fludarabina, la radioterapia a fasci esterni (XRT), la ciclofosfamida o anticorpi come OKT3 o CAMPATH. In un'altra forma di realizzazione, le cellule vengono isolate prima e possono essere congelate per essere utilizzate successivamente per il trattamento dopo una terapia ablativa delle cellule B, come gli agenti che reagiscono con il CD20, *ad esempio* Rituxan.

In alcune forme di realizzazione, le cellule T sono ottenute da un paziente direttamente dopo il trattamento. A questo proposito, è stato osservato che dopo alcuni trattamenti antitumorali, in particolare quelli con farmaci che danneggiano il sistema immunitario, poco dopo il trattamento, durante il periodo in cui i pazienti si starebbero normalmente riprendendo dal trattamento, la qualità delle cellule T ottenute può essere ottimale o migliorata per la loro capacità di espandersi *ex vivo*. Allo stesso modo, dopo la manipolazione *ex vivo* con i metodi qui descritti, queste cellule possono trovarsi in uno stato preferenziale per un migliore inesto ed espansione *in vivo*. Pertanto, nel contesto della presente invenzione è contemplata la raccolta di cellule del sangue, comprese le cellule T, le cellule dendritiche o altre cellule del lignaggio ematopoietico, durante questa fase di recupero. Inoltre, in alcune forme di realizzazione, la mobilizzazione (*ad esempio*, la mobilizzazione con GM-CSF) e i regimi di condizionamento possono essere utilizzati per creare in un soggetto una condizione che favorisca il ripopolamento, il ricircolo, la rigenerazione e/o l'espansione di particolari tipi di cellule, soprattutto durante un periodo di tempo definito dopo la terapia. Tra i tipi di cellule esemplificativi vi sono i linfociti T, i linfociti B, le cellule dendritiche e altre cellule del sistema immunitario.

2. Attivazione ed espansione delle cellule T (La sezione "Attivazione ed espansione delle cellule T" è indicata come riferimento. Le forme di realizzazione riportate in questa sezione non sono forme di realizzazione dell'invenzione)

Sia prima che dopo la modifica genetica delle cellule T con i CAR qui descritti, le cellule T possono essere attivate ed espanse in generale con i metodi descritti, *ad esempio*, nei Brevetti U.S. n. 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; e nella Pubblicazione della Domanda di Brevetto U.S. n. 20060121005.

In generale, le cellule T possono essere espanse tramite il contatto con una superficie a cui è attaccato un agente che stimola un segnale associato al complesso CD3/TCR e un ligando che stimola una molecola co-stimolatoria sulla superficie delle cellule T. In particolare, le popolazioni di cellule T possono essere stimulate come descritto nel presente documento, ad esempio mediante il contatto con un anticorpo anti-CD3, o un suo frammento legante l'antigene, o un anticorpo anti-CD2 immobilizzato su una superficie, o mediante il contatto con un attivatore della proteina chinasi C (*ad esempio*, la briostatina) in combinazione con uno ionoforo di calcio. Per la co-stimolazione di una molecola accessoria sulla superficie delle cellule T, si utilizza un ligando che lega la molecola accessoria. Ad esempio, una popolazione di cellule T può essere messa a contatto con un anticorpo anti-CD3 e un anticorpo anti-CD28, in condizioni adeguate a stimolare la proliferazione delle cellule T. Per stimolare la proliferazione delle cellule T CD4+ o CD8+, un anticorpo anti-CD3 e un anticorpo anti-CD28. Esempi di anticorpi anti-CD28 includono 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacione, Besancon, Francia) e possono essere utilizzati altri metodi comunemente noti nella tecnica (Berg et al., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., *J. Exp. Med.* 190(9): 13191328, 1999; Garland et al., *J. Immunol Meth.* 227(1-2): 53-63, 1999).

In alcune forme di realizzazione, il segnale stimolatorio primario e il segnale co-stimolatorio per le cellule T possono essere forniti da protocolli diversi. Ad esempio, gli agenti che forniscono ciascun segnale possono essere in soluzione o accoppiati a una superficie. Quando sono accoppiati a una superficie, gli agenti possono essere accoppiati alla stessa superficie (vale a dire in formazione "cis") o a superfici separate (vale a dire in formazione "trans"). In alternativa, un agente può essere accoppiato a una superficie e l'altro agente in soluzione. In una forma di realizzazione, l'agente che fornisce il segnale co-stimolatorio è legato a una superficie cellulare e l'agente che fornisce il segnale di attivazione primaria è in soluzione o accoppiato a una superficie. In alcune forme di realizzazione, entrambi gli agenti possono essere in soluzione. In un'altra forma di realizzazione, gli agenti possono essere in forma solubile e poi reticolati a una superficie, come una cellula che esprime recettori Fc o un anticorpo o un altro agente legante che si legherà agli agenti. A questo proposito, vedere ad esempio, le Pubblicazioni della Domanda di Brevetto U.S. n. 20040101519 e 20060034810 per le cellule presentanti l'antigene artificiali (aAPC) che possono essere utilizzate per attivare ed espandere le cellule T nella presente invenzione.

In alcune forme di realizzazione, i linfociti T sono combinati con microsfere rivestite di agente, le microsfere e le cellule sono successivamente separate e le cellule sono coltivate. In una forma di realizzazione alternativa, prima della coltura, le microsfere rivestite di agente e le cellule non vengono separate, ma coltivate insieme. In un'ulteriore forma di realizzazione, le microsfere e le cellule vengono prima concentrate mediante l'applicazione di una forza, ad esempio una forza magnetica, che determina una maggiore legatura dei marcatori della superficie cellulare, inducendo

così la stimolazione delle cellule.

A titolo di esempio, le proteine della superficie cellulare possono essere legate permettendo alle microsfere paramagnetiche a cui sono attaccati gli anti-CD3 e anti-CD28 (microsfere 3x28) di entrare in contatto con le cellule T. In una forma di realizzazione, le cellule (ad esempio, da 10^4 a 10^9 cellule T) e le microsfere (ad esempio, le microsfere paramagnetiche DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 in rapporto 1:1) sono combinate in un tampone, preferibilmente PBS (senza cationi divalenti come calcio e magnesio). Anche in questo caso, chi è comunemente esperto nella tecnica può facilmente comprendere che è possibile utilizzare qualsiasi concentrazione di cellule. Ad esempio, la cellula target può essere molto rara nel campione e comprendere solo lo 0,01% del campione oppure l'intero campione (vale a dire il 100%) può comprendere la cellula target di interesse. Di conseguenza, qualsiasi numero di cella rientra nel contesto della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, può essere auspicabile diminuire significativamente il volume in cui le particelle e le cellule sono mescolate insieme (vale a dire, aumentare la concentrazione di cellule), per garantire il massimo contatto tra cellule e particelle. Ad esempio, in una forma di realizzazione si utilizza una concentrazione di circa 2 miliardi di cellule/ml. In un'altra forma di realizzazione, si utilizzano più di 100 milioni di cellule/ml. In un'ulteriore forma di realizzazione, si utilizza una concentrazione di cellule di 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 milioni di cellule/ml. In un'altra forma di realizzazione, si utilizza una concentrazione di cellule compresa tra 75, 80, 85, 90, 95 o 100 milioni di cellule/ml. In ulteriori forme di realizzazione, si possono utilizzare concentrazioni di 125 o 150 milioni di cellule/ml. L'uso di concentrazioni elevate può aumentare la resa cellulare, l'attivazione e l'espansione delle cellule. Inoltre, l'uso di alte concentrazioni cellulari consente di catturare in modo più efficiente le cellule che possono esprimere debolmente gli antigeni target di interesse, come le cellule T CD28-negative. Tali popolazioni di cellule possono avere un valore terapeutico e sarebbe auspicabile ottenerle in alcune forme di realizzazione. Ad esempio, l'utilizzo di un'alta concentrazione di cellule consente una selezione più efficiente delle cellule T CD8+ che normalmente hanno un'espressione CD28 più debole.

In alcune forme di realizzazione, la miscela può essere messa in coltura da alcune ore (circa 3 ore) a circa 14 giorni o qualsiasi valore intero orario intermedio. In un'altra forma di realizzazione, la miscela può essere messa in coltura per 21 giorni. In una forma di realizzazione dell'invenzione, le microsfere e le cellule T vengono coltivate insieme per circa otto giorni. In un'altra forma di realizzazione, le microsfere e le cellule T vengono coltivate insieme per 2-3 giorni. Si possono anche desiderare diversi cicli di stimolazione, in modo che il tempo di coltura delle cellule T possa essere di 60 giorni o più. Le condizioni appropriate per la coltura delle cellule T comprendono un terreno di coltura appropriato (*ad esempio*, Minimal Essential Media o RPMI Media 1640 o X-vivo 15, (Lonza)) che può contenere i fattori necessari per la proliferazione e la vitalità, tra cui siero (*ad esempio* siero fetale bovino o umano), interleuchina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β e TNF- α o qualsiasi

altro additivo per la crescita delle cellule noto all'esperto della tecnica. Altri additivi per la crescita delle cellule includono, ma non solo, tensioattivi, plasmanati e agenti riducenti come N-acetilcisteina e 2-mercaptoetanolo. I terreni di coltura possono includere RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 e X-Vivo 20, Optimizer, con l'aggiunta di amminoacidi, piruvato di sodio e vitamine, senza siero o integrati con un'appropriata quantità di siero (o plasma) o una serie definita di ormoni, e/o una quantità di citochine sufficiente per la crescita e l'espansione delle cellule T. Gli antibiotici, *ad esempio* la penicillina e la streptomina, sono inclusi solo nelle colture sperimentali, non nelle colture di cellule che devono essere infuse in un soggetto. Le cellule target sono mantenute in condizioni necessarie a supportare la crescita, ad esempio una temperatura (*ad esempio*, 37°C) e un'atmosfera (*ad esempio*, aria più 5% di CO₂) appropriate. Le cellule T esposte a tempi di stimolazione diversi possono presentare caratteristiche diverse. Ad esempio, i tipici prodotti di sangue o di cellule mononucleate di sangue periferico di aferesi hanno una popolazione di cellule T helper (TH, CD4+) superiore alla popolazione di cellule T citotossiche o soppressorie (TC, CD8). L'espansione ex vivo delle cellule T attraverso la stimolazione dei recettori CD3 e CD28 produce una popolazione di cellule T che prima di circa 8-9 giorni è costituita prevalentemente da cellule TH, mentre dopo circa 8-9 giorni, la popolazione di cellule T comprende una popolazione sempre maggiore di cellule TC. Di conseguenza, a seconda dello scopo del trattamento, può essere vantaggioso infondere in un soggetto una popolazione di cellule T composta prevalentemente da cellule TH. Allo stesso modo, se è stato isolato un sottogruppo di cellule TC antigene-specifiche, può essere utile espandere questo sottogruppo in misura maggiore.

Inoltre, oltre ai marcatori CD4 e CD8, altri marcatori fenotipici variano in modo significativo, ma in gran parte riproducibile, nel corso del processo di espansione cellulare. La riproducibilità consente quindi di personalizzare un prodotto a base di cellule T attivate per scopi specifici.

V. Composizioni farmaceutiche

La presente invenzione prevede inoltre composizioni farmaceutiche che comprendono una qualsiasi cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata comprendente un qualsiasi CAR dell'invenzione e un carrier farmaceuticamente accettabile. Le composizioni farmaceutiche possono essere preparate mescolando una pluralità di cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate aventi il grado di purezza desiderato con carrier, eccipienti o stabilizzatori farmaceuticamente accettabili facoltativi (Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edizione, Osol, A. Ed. (1980)), sotto forma di formulazioni liofilizzate o soluzioni acquose.

I carrier, gli eccipienti o gli stabilizzatori accettabili non sono tossici per i riceventi ai dosaggi e alle concentrazioni impiegati e comprendono tamponi, antiossidanti, tra cui acido ascorbico, metionina, vitamina E, metabisolfito di sodio; conservanti, isotonzanti, stabilizzatori, complessi metallici (*ad esempio* complessi Zn-proteina); agenti chelanti come l'EDTA e/o tensioattivi non ionici.

I tamponi vengono utilizzati per controllare il pH in un intervallo che ottimizza l'efficacia terapeutica, soprattutto se la stabilità dipende dal pH. I tamponi sono preferibilmente presenti in concentrazioni comprese tra circa 50 mM e circa 250 mM. Gli agenti tampone adatti all'uso con la presente invenzione includono acidi organici e inorganici e loro sali. Ad esempio, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, ossalato, lattato, acetato. Inoltre, i tamponi possono comprendere sali di istidina e trimetilammina, come il Tris.

I conservanti vengono aggiunti per ritardare la crescita microbica e sono tipicamente presenti in un intervallo compreso tra 0,2%-1,0% (p/v). Tra i conservanti adatti all'uso con la presente invenzione vi sono il cloruro di ottadecildimetilbenzilammonio; il cloruro di esametonio; gli alogenuri di benzalconio (*ad esempio*, cloruro, bromuro, ioduro), il cloruro di benzetonio; il thimerosal, il fenolo, l'alcol butilico o benzilico; i parabeni alchilici, come il parabene metilico o propilico; il catecolo; il resorcinolo; il cicloesano, il 3-pentanol e l'm-cresolo.

Gli agenti tonici, talvolta noti come "stabilizzatori", sono presenti per regolare o mantenere la tonicità del liquido in una composizione. Quando vengono utilizzati con biomolecole grandi e cariche, come proteine e anticorpi, sono spesso definiti "stabilizzatori" perché possono interagire con i gruppi carichi delle catene laterali degli amminoacidi, riducendo così il potenziale di interazioni inter e intramolecolari. Gli agenti tonici possono essere presenti in quantità comprese tra lo 0,1% e il 25% in peso, preferibilmente dall'1 al 5%, tenendo conto delle quantità relative degli altri ingredienti. Tra gli agenti tonificanti preferiti vi sono gli alcoli di zucchero poliidrici, preferibilmente triidrici o superiori, come glicerina, eritritolo, arabitolo, xilitolo, sorbitolo e mannitolo.

Ulteriori eccipienti includono agenti che possono servire come uno o più dei seguenti: (1) agenti di carica, (2) esaltatori di solubilità, (3) stabilizzatori e (4) agenti che impediscono la denaturazione o l'adesione alla parete del contenitore. Tali eccipienti comprendono: alcoli di zucchero poliidrici (elencati sopra); amminoacidi come alanina, glicina, glutammina, asparagina, istidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, acido glutammico, treonina, eccetera, zuccheri organici o alcoli dello zucchero come saccarosio, lattosio, lattitolo, trealosio, stachiosio, mannosio, sorbosio, xilosio, ribosio, ribitolo, mioiniosio, mioinisitolo, galattosio, galattitolo, glicerolo, ciclitoli (*ad esempio* inositolo), polietilenglicole; agenti riducenti contenenti zolfo, come urea, glutatione, acido tiottico, tioglicolato di sodio, tioglicerolo, α -monotiglicerolo e tio solfato di sodio; proteine a basso peso molecolare, come sieroalbumina umana, sieroalbumina bovina, gelatina o altre immunoglobuline; polimeri idrofili, come polivinilpirrolidone; monosaccaridi (*ad esempio*, xilosio, mannosio, fruttosio, glucosio); disaccaridi (*ad esempio* lattosio, maltosio, saccarosio); trisaccaridi come il raffiniosio; e polisaccaridi come la destrina o il destrano.

I tensioattivi non ionici o i detergenti (noti anche come "agenti umettanti") sono presenti per aiutare a solubilizzare l'agente terapeutico e per proteggere la proteina terapeutica dall'aggregazione indotta dall'agitazione, consentendo inoltre alla formulazione di essere esposta a sollecitazioni superficiali

di taglio senza causare la denaturazione della proteina terapeutica attiva o dell'anticorpo. I tensioattivi non ionici sono presenti in un intervallo compreso tra circa 0,05 mg/ml e circa 1,0 mg/ml, preferibilmente tra circa 0,07 mg/ml e circa 0,2 mg/ml.

Tra i tensioattivi non ionici idonei vi sono i polisorbati (20, 40, 60, 65, 80, eccetera), i poliossameri (184, 188, eccetera), i polioli PLURONIC®, TRITON®, i monoeteri di poliossietilene sorbitano (TWEEN®-20, TWEEN®-80, eccetera), lauramacrogol 400, stearato di poliossile 40, olio di ricino idrogenato di poliossietilene 10, 50 e 60, monostearato di glicerolo, estere di acidi grassi di saccarosio, metilcellulosa e carbosimetilcellulosa. I detergenti anionici che possono essere utilizzati includono il laurilsolfato di sodio, il solfosuccinato di diottile di sodio e il solfonato di diottile di sodio. I detergenti cationici includono il cloruro di benzalconio o il cloruro di benzetonio.

Per poter essere utilizzate per la somministrazione in vivo, le composizioni farmaceutiche devono essere sterili. La composizione farmaceutica può essere resa sterile mediante filtrazione attraverso membrane filtranti sterili. Le composizioni farmaceutiche qui descritte vengono generalmente inserite in un contenitore dotato di una luce di accesso sterile, ad esempio una sacca o una fiala per soluzioni endovenose con un tappo perforabile da un ago da iniezione ipodermica.

La via di somministrazione è conforme ai metodi noti e accettati, ad esempio mediante bolo singolo o multiplo o infusione per un lungo periodo di tempo in modo adeguato, *ad esempio* mediante iniezione o infusione per via sottocutanea, endovenosa, intraperitoneale, intramuscolare, intraarteriosa, intralesionale o intraarticolare, somministrazione topica, inalazione o mediante mezzi a rilascio prolungato o a rilascio prolungato.

Si possono preparare preparazioni a rilascio prolungato. Esempi adatti di preparazioni a rilascio prolungato includono matrici semipermeabili di polimeri idrofobici solidi contenenti l'antagonista, che si presentano sotto forma di articoli sagomati, *ad esempio* film, o microcapsule. Esempi di matrici a rilascio prolungato sono i poliesteri, gli idrogel (ad esempio, il poli(2-idrossietil-metacrilato) o il poli(vinilalcol)), i polilattidi (Brevetto U.S. n. 3,773,919), copolimeri di acido L-glutammico ed etil-L-glutammato, etilene-vinilacetato non degradabile, copolimeri degradabili di acido lattico-glicolico come il LUPRON DEPOT™ (microsfere iniettabili composte da copolimero di acido lattico-glicolico e leuprolide acetato) e acido poli-D-(-)-3-idrossibutirrico.

Le composizioni farmaceutiche qui descritte possono contenere anche più di un composto o agente attivo, come necessario per la particolare indicazione da trattare, preferibilmente quelli con attività complementari che non si influenzano reciprocamente. In alternativa o in aggiunta, la composizione può comprendere un agente citotossico, un agente chemioterapico, una citochina, un agente immunosoppressivo o un agente inibitore della crescita. Tali molecole sono opportunamente presenti in combinazione in quantità efficaci per lo scopo prefissato.

I principi attivi possono anche essere intrappolati in microcapsule preparate, ad esempio, con tecniche di conservazione o di polimerizzazione

interfacciale, ad esempio microcapsule di idrossimetilcellulosa o gelatina e microcapsule di poli-(metilmetacrilato), rispettivamente, in sistemi colloidali di rilascio dei farmaci (ad esempio, liposomi, microsfele di albumina, microemulsioni, nanoparticelle e nanocapsule) o in macroemulsioni. Tali tecniche sono descritte in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 18a edizione.

VI. Usi nei metodi di trattamento del cancro

La presente invenzione fornisce inoltre un CAR o una composizione farmaceutica dell'invenzione da utilizzare nei metodi di immunoterapia cellulare. In alcune forme di realizzazione, l'immunoterapia cellulare è destinata al trattamento del cancro, compresi, ma non solo, i tumori maligni ematologici e i tumori solidi. Tutti gli anticorpi a dominio singolo, i recettori antigenici chimerici e le cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate qui descritti possono essere utilizzati nel metodo di trattamento del cancro. I CAR qui descritti possono essere utili per il trattamento di tumori con mutazioni di escape per perdita di antigene e per ridurre la resistenza alle terapie esistenti. In alcune forme di realizzazione, le composizioni dell'invenzione possono essere utilizzate in metodi per il trattamento di altre malattie associate agli antigeni specificamente riconosciuti dagli anticorpi a dominio singolo o dai CAR, tra cui, ad esempio, le malattie autoimmuni.

In alcune forme di realizzazione, vi è un metodo di trattamento di un cancro in un individuo (come un individuo umano), comprendente la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di una composizione farmaceutica comprendente: (1) una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un recettore antigenico chimerico (CAR) multispecifico (per esempio bispecifico) dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un primo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente a un primo antigene (come un primo antigene tumorale) e un secondo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente a un secondo antigene (come un secondo antigene tumorale); (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui il primo antigene è diverso dal secondo antigene; e (2) un carrier farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, il primo antigene e/o il secondo antigene è selezionato dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb e/o il secondo sdAb è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, il primo anticorpo a dominio singolo e il secondo anticorpo a dominio singolo sono fusi l'uno all'altro mediante un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice

immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR multispecifico comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR multispecifico comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un primo dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28, un secondo dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogena. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un cancro liquido, come il mieloma multiplo, la leucemia linfoblastica acuta o la leucemia linfocitica cronica. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un cancro solido.

In alcune forme di realizzazione, vi è un metodo di trattamento di un cancro in un individuo (come un individuo umano), comprendente la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di una composizione farmaceutica comprendente: (1) una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un CAR BCMA \times CD38 dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA e un anticorpo a dominio singolo anti-CD38; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare; e (2) un carrier farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA e/o l'sdAb anti-CD38 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA e l'anticorpo a dominio singolo anti-CD38 sono fusi l'uno all'altro mediante un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune

forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA è fuso al terminale N dell'sdAb anti-CD38. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA è fuso al terminale C dell'sdAb anti-CD38. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 144-151. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA \times CD38 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA \times CD38 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-BCMA comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 18 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:29. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-CD38 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:44, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:56 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:68. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA \times CD38 comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 207-216. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogena. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un cancro liquido. In alcune forme di realizzazione, il cancro liquido è mieloma multiplo.

In alcune forme di realizzazione, vi è un metodo di trattamento di un cancro in un individuo (come un individuo umano), comprendente la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di una composizione farmaceutica comprendente: (1) un CAR CD19 \times CD20 dell'invenzione

comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 e un anticorpo a dominio singolo anti-CD20; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare; e (2) un carrier farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 e/o l'sdAb anti-CD20 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 e l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 sono fusi l'uno all'altro mediante un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è fuso al terminale N dell'sdAb anti-CD20. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è fuso al terminale C dell'sdAb anti-CD20. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico ha una lunghezza non superiore a circa 50 (come non superiore a circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidico comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 144-151. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 \times CD20 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 \times CD20 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-CD20 comprende una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:4, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:5 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:6. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 \times CD20 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 206. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di

realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogenica. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un cancro liquido. In alcune forme di realizzazione, il cancro liquido è linfoma a cellule B.

In alcune forme di realizzazione, vi è un metodo di trattamento di un cancro in un individuo (come un individuo umano), comprendente la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di una composizione farmaceutica comprendente: (1) una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un recettore antigenico chimerico multivalente dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente una pluralità di anticorpi a dominio singolo (sdAb) che si legano specificamente a un antigene (come un antigene tumorale); (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare; e (2) un carrier farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, l'antigene è selezionato dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77. In alcune forme di realizzazione, la pluralità di sdAb è camelide, chimerica o umanizzata. In alcune forme di realizzazione, la pluralità di anticorpi a dominio singolo è fusa reciprocamente tramite legami peptidici o linker peptidici. In alcune forme di realizzazione, ciascun legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria deriva da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente comprende anche un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 198-201 e 265-270. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di

realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogenica. In alcune forme di realizzazione, il tumore è un tumore liquido, come mieloma multiplo, leucemia linfoblastica acuta o leucemia linfocitica cronica. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un cancro solido.

In alcune forme di realizzazione, vi è un metodo per trattare un cancro in un individuo (ad esempio un individuo umano), che comprende la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di una composizione farmaceutica che comprende: (1) una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) che comprende un recettore antigenico chimerico multivalente dell'invenzione che comprende un polipeptide che comprende: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un primo anticorpo a dominio singolo che si lega specificamente a un primo epitopo di un antigene (ad esempio un antigene tumorale) e un secondo anticorpo a dominio singolo che si lega specificamente a un secondo epitopo dell'antigene; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, dove il primo epitopo e il secondo epitopo sono diversi; e (2) un carrier farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, l'antigene è selezionato dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77. In alcune forme di realizzazione, il primo sdAb e/o il secondo sdAb sono camelidi, chimerici, umani o umanizzati. In alcune forme di realizzazione, il primo anticorpo a dominio singolo e il secondo anticorpo a dominio singolo sono fusi l'uno all'altro tramite un legame peptidico o un linker peptidico. In alcune forme di realizzazione, il legante peptidico non ha una lunghezza superiore a circa 50 (ad esempio non più di circa 35, 25, 20, 15, 10 o 5) amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, il dominio transmembrana è selezionato dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare deriva da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria deriva da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR multivalente comprende anche un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogenica. In alcune forme di realizzazione, il tumore è un tumore

liquido, come mieloma multiplo, leucemia linfoblastica acuta o leucemia linfocitica cronica. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un cancro solido.

In alcune forme di realizzazione, vi è un metodo di trattamento di un cancro in un individuo (come un individuo umano), comprendente la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di una composizione farmaceutica comprendente: (1) una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un recettore antigenico chimerico CD19 dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD19; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui l'sdAb anti-CD19 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3; e (2) un carrier farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD19 comprende un dominio V_HH comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD19 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8α, il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8α, un dominio transmembrana CD28, un primo dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28, un secondo dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3ζ. Presentato come riferimento, il CAR CD19 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 248. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogena. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un cancro liquido, come mieloma multiplo, leucemia linfoblastica acuta o leucemia linfocitica cronica. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un cancro solido.

In alcune forme di realizzazione, vi è un metodo di trattamento di un cancro in un individuo (come un individuo umano), comprendente la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di una composizione farmaceutica comprendente: (1) una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un CAR CD20 dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD20; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare, in cui l'sdAb anti-CD20 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:4, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:5 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:6; e (2) un carrier farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD20 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD20 comprende inoltre una FR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 244, una FR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 245, una FR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 246 e/o una FR4 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 247. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD20 comprende un dominio V_HH comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD20 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8α, il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8α, un dominio transmembrana CD28, un primo dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28, un secondo dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3ζ. Presentato come riferimento, il CAR CD20 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 249. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogenica. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un cancro liquido, come mieloma multiplo, leucemia linfoblastica acuta o leucemia linfocitica cronica. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un cancro solido.

In alcune forme di realizzazione, vi è un metodo di trattamento di un cancro in un individuo (come un individuo umano), comprendente la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di una composizione farmaceutica comprendente: (1) una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) dell'invenzione comprendente un CAR BCMA dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare; e (2) un carrier farmaceuticamente accettabile, in cui l'sdAb anti-BCMA comprende uno qualsiasi di quanto segue:

(23) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:18; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:29;

(24) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:8; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:19; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:30;

(25) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:9; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:20; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:31;

(26) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:10; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:21; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:32;

(27) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 11; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:22; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:33;

(28) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 12; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:23; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:34;

(29) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 13; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:24; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:35;

(30) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 14; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:25; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:36;

(31) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 15; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:26; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:37;

(32) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 16; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:27; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:38; o

(33) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 17; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:28; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:39.

In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-BCMA comprende un dominio V_HH con una sequenza amminoacidica del gruppo costituito da SEQ ID NO:78-88. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA comprende anche un dominio cerniera (ad esempio un dominio cerniera CD8 α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR BCMA comprende anche un peptide segnale (ad esempio un peptide segnale CD8 α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD28, un primo dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD28, un secondo dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio primario di segnalazione intracellulare derivato da CD3 ζ . In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD8 α , un dominio di segnalazione co-stimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3 ζ . Divulgato come riferimento, il CAR BCMA comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 152-162. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogenica. In alcune forme di realizzazione, il tumore è un tumore liquido, come il mieloma multiplo, la leucemia linfoblastica acuta o la leucemia linfocitica cronica. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un cancro solido.

In alcune forme di realizzazione, vi è un metodo di trattamento di un cancro in un individuo (come un individuo umano), comprendente la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di una composizione farmaceutica comprendente: (1) una cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata (come una cellula T) comprendente un CAR CD38 dell'invenzione comprendente un polipeptide comprendente: (a) un dominio

extracellulare di legame con l'antigene comprendente un sdAb anti-CD38; (b) un dominio transmembrana; e (c) un dominio di segnalazione intracellulare; e (2) un carrier farmaceuticamente accettabile, in cui l'sdAb anti-CD38 comprende uno qualsiasi di quanto segue:

(25) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:40; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:52; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:64;

(26) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:41; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:53; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:65;

(27) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:42; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:54; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:66;

(28) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:43; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:55; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:67;

(29) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:44; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:56; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:68;

(30) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:45; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:57; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:69;

(31) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:46; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:58; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:70;

(32) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:47; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:59; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:71;

(33) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:48; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:60; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:72;

(34) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:49; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:61; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:73;

(35) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:50; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:62; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:74; o

(36) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:51; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:63; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:75.

In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD38 è camelide, chimerico o umanizzato. In alcune forme di realizzazione, l'sdAb anti-CD38 comprende un dominio V_HH comprendente una sequenza amminoacidica del gruppo costituito da SEQ ID NO:89-100. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria (come una cellula T). In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare primario deriva da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione costimolatoria. In alcune forme di realizzazione, il dominio di segnalazione costimolatoria deriva da una molecola costimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 comprende inoltre un dominio cerniera (come un dominio cerniera CD8α) localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare di legame con l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana. In alcune forme di realizzazione, il CAR CD38 comprende inoltre un peptide segnale (come un peptide segnale CD8α) localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8α, il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8α, un dominio transmembrana CD28, un primo dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD28, un secondo dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3ζ. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide comprende, dal terminale N al terminale C: un peptide segnale CD8α, il dominio extracellulare di legame con l'antigene, un dominio cerniera CD8α, un dominio transmembrana CD8α, un dominio di segnalazione costimolatoria derivato da CD137 e un dominio di segnalazione intracellulare primario derivato da CD3ζ. Qui presentato come riferimento, il CAR CD38 comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 163-174. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è autologa. In alcune forme di realizzazione, la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è allogena. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un cancro liquido, come mieloma multiplo, leucemia linfoblastica acuta o leucemia linfocitica cronica. In alcune forme di realizzazione, il cancro è un cancro solido.

Viene presentato come riferimento un metodo di trattamento di una malattia (come il cancro) in un individuo (come un individuo umano), comprendente la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di una composizione farmaceutica comprendente un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 e un carrier farmaceuticamente accettabile, in cui l'anticorpo a dominio singolo anti-CD19 comprende tre CDR comprendenti: (a)

una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 2; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 3. In alcuni esempi, l'sdAb anti-CD19 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 76.

Viene presentato come riferimento un metodo di trattamento di una malattia (come il cancro) in un individuo (come un individuo umano), comprendente la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di una composizione farmaceutica comprendente un anticorpo a dominio singolo anti-CD19 e un carrier farmaceuticamente accettabile, in cui l'anticorpo a dominio singolo anti-CD20 comprende tre CDR comprendenti: (a) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 4; (b) una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 5; e (c) una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 6. In alcuni esempi, l'sdAb anti-CD20 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 77.

Viene presentato come riferimento un metodo di trattamento di una malattia (come il cancro) in un individuo (come un individuo umano), comprendente la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di una composizione farmaceutica comprendente un anticorpo a dominio singolo anti-BCMA e un carrier farmaceuticamente accettabile, in cui l'sdAb anti-BCMA comprende uno qualsiasi di quanto segue:

(1) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:18; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:29;

(2) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:8; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:19; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 30;

(3) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:9; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:20; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:31;

(4) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:10; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:21; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:32;

(5) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:22; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:33;

(6) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:12; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:23; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:34;

(7) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 13; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:24;

e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:35;

(8) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:14; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:25;

e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 36;

(9) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:15; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:26;

e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:37;

(10) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 16; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:27; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:38; oppure

(11) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 17; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:28 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:39.

In alcuni esempi, l'sdAb anti-BCMA comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 78-88.

Viene presentato come riferimento un metodo di trattamento di una malattia (come il cancro) in un individuo (come un individuo umano), comprendente la somministrazione all'individuo di una quantità efficace di una composizione farmaceutica comprendente un anticorpo a dominio singolo anti-CD38 e un carrier farmaceuticamente accettabile, in cui l'sdAb anti-CD38 comprende uno qualsiasi di quanto segue: una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:40; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:52; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:64;

(1) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:41; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:53; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:65;

(2) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:42; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:54; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:66;

(3) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:43; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:55; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:67;

(4) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:44; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:56; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:68;

(5) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:45; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:57; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:69;

- (6) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:46; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:58; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:70;
- (7) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:47; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:59; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:71;
- (8) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:48; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:60; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:72;
- (9) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:49; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:61; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:73;
- (10) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:50; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:62; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:74; o
- (11) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:51; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:63; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:75.

In alcuni esempi, l'sdAb anti-CD38 comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 89-100.

I metodi qui descritti sono adatti al trattamento di vari tipi di cancro, compresi quelli solidi e liquidi. I metodi sono applicabili a tumori di tutti gli stadi, compresi quelli in fase iniziale, avanzata e metastatica. I metodi qui descritti possono essere utilizzati come prima terapia, seconda terapia, terza terapia o terapia combinata con altri tipi di terapie antitumorali note nella tecnica, come la chemioterapia, la chirurgia, le radiazioni, la terapia genica, l'immunoterapia, il trapianto di midollo osseo, il trapianto di cellule staminali, la terapia mirata, la crioterapia, la terapia a ultrasuoni, la terapia fotodinamica, l'ablazione a radio-frequenza o simili, in un contesto adiuvante o in un contesto neoadiuvante.

La somministrazione delle composizioni farmaceutiche può avvenire in qualsiasi modo conveniente, anche per iniezione, ingestione, trasfusione, impianto o trapianto. Le composizioni possono essere somministrate a un paziente per via transarteriosa, sottocutanea, intradermica, intratumorale, intranodale, intramidollare, intramuscolare, endovenosa o intraperitoneale. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica viene somministrata per via sistemica. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica viene somministrata a un individuo per infusione, ad esempio per via endovenosa. Le tecniche di infusione per l'immunoterapia sono note nella tecnica (vedere, *ad esempio*, Rosenberg *et al.*, New Eng. J. of Med. 319: 1676 (1988)). In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica viene somministrata a un individuo mediante iniezione intradermica o sottocutanea. In alcune forme di realizzazione, le composizioni sono somministrate per iniezione endovenosa. In alcune forme di

realizzazione, le composizioni vengono iniettate direttamente in un tumore o in un linfonodo. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica viene somministrata localmente in un sito tumorale, ad esempio direttamente nelle cellule tumorali o in un tessuto con cellule tumorali. Il mieloma multiplo (MM) è una neoplasia aggressiva incurabile del plasma, classificata come neoplasia delle cellule B, che prolifera in modo incontrollato nel midollo osseo, interferendo con la normale produzione metabolica delle cellule del sangue e causando lesioni ossee dolorose (Garfall, A.L. *et al.*, *Discovery Med.* 2014, 17, 37). Il mieloma multiplo può presentarsi clinicamente con ipercalcemia, insufficienza renale, anemia, lesioni ossee, infezioni batteriche, iperviscosità e amiloidosi (Robert Z. Orlowski, *Cancer Cell.* 2013, 24(3)). Secondo le indagini e le statistiche, ogni anno a circa 86.000 pazienti viene diagnosticato un mieloma, mentre circa 63.000 pazienti muoiono ogni anno a causa delle complicazioni legate alla malattia (Becker, 2011). A causa dell'invecchiamento della popolazione, si prevede che il numero di casi di mieloma aumenterà di anno in anno. Come per molti tumori, non esiste una causa nota del mieloma multiplo, né una cura. Alcuni trattamenti per il mieloma multiplo sono simili a quelli per altri tipi di cancro, come la chemioterapia o la radioterapia, il trapianto di cellule staminali o il trapianto di midollo osseo, la terapia mirata o la terapia biologica (George, 2014). Le immunoterapie cellulari basate su anticorpi hanno dimostrato un sostanziale beneficio clinico per i pazienti affetti da neoplasie ematologiche, in particolare nel linfoma Non-Hodgkin a cellule B. Esiste la necessità di un agente immunoterapeutico efficace per il trattamento del mieloma multiplo.

I dosaggi e la concentrazione di farmaco desiderata delle composizioni farmaceutiche della presente invenzione possono variare a seconda dell'uso particolare previsto. La determinazione del dosaggio o della via di somministrazione appropriati è di competenza del tecnico comune. Gli esperimenti sugli animali forniscono una guida affidabile per la determinazione di dosi efficaci per la terapia umana. La scalatura interspecie delle dosi efficaci può essere effettuata seguendo i principi stabiliti da Mordenti, J. e Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics", in *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, Ed., Pergamon Press, New York 1989, pagg. 42-46. Nell'ambito della presente invenzione è possibile che formulazioni diverse siano efficaci per trattamenti diversi e per disturbi diversi e che la somministrazione destinata al trattamento di un organo o di un tessuto specifico possa richiedere una modalità di somministrazione diversa da quella per un altro organo o tessuto.

In riferimento, dove la composizione farmaceutica comprende uno qualsiasi degli anticorpi a dominio singolo qui descritti, la composizione farmaceutica viene somministrata al dosaggio di circa 10 ng/kg fino a circa 100 mg/kg di peso corporeo dell'individuo o più al giorno, per esempio, a circa 1 mg/kg/giorno fino a 10 mg/kg/giorno, a seconda della via di somministrazione. In letteratura sono disponibili indicazioni su dosaggi e metodi di somministrazione particolari; vedere, ad esempio, i Brevetti U.S. n. 4,657,760; 5,206,344; o 5,225,212.

In alcune forme di realizzazione, in cui la composizione farmaceutica comprende una qualsiasi delle cellule immunitarie ingegnerizzate

dell'invenzione, la composizione farmaceutica viene somministrata a un dosaggio di almeno 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , o 10^9 cellule/kg di peso corporeo dell'individuo. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica viene somministrata a un dosaggio compreso tra circa 10^4 e circa 10^5 , tra circa 10^5 e circa 10^6 , tra circa 10^6 e circa 10^7 , tra circa 10^7 e circa 10^8 , tra circa 10^8 e circa 10^9 , tra circa 10^4 e circa 10^9 , tra circa 10^4 e circa 10^6 , tra circa 10^6 e circa 10^8 , o tra circa 10^5 e circa 10^7 cellule/kg di peso corporeo dell'individuo.

In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica viene somministrata per una sola volta. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica viene somministrata più volte (ad esempio 2, 3, 4, 5, 6 o più volte). In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica viene somministrata una volta a settimana, una volta a 2 settimane, una volta a 3 settimane, una volta a 4 settimane, una volta al mese, una volta a 2 mesi, una volta a 3 mesi, una volta a 4 mesi, una volta a 5 mesi, una volta a 6 mesi, una volta a 7 mesi, una volta a 8 mesi, una volta a 9 mesi o una volta all'anno. In alcune forme di realizzazione, l'intervallo tra le somministrazioni è compreso tra 1 settimana e 2 settimane, 2 settimane e 1 mese, 2 settimane e 2 mesi, 1 mese e 2 mesi, 1 mese e 3 mesi, 3 mesi e 6 mesi o 6 mesi e un anno. Il dosaggio e il regime di trattamento ottimali per un particolare paziente possono essere facilmente determinati da una persona esperta nella tecnica della medicina, monitorando il paziente per individuare i segni della malattia e adattando il trattamento di conseguenza.

Inoltre, i dosaggi possono essere somministrati mediante una o più somministrazioni separate, oppure mediante infusione continua. Per somministrazioni ripetute per diversi giorni o più, a seconda della patologia, il trattamento viene mantenuto fino alla soppressione desiderata dei sintomi della malattia. Tuttavia, possono essere utili altri regimi di dosaggio. Il progresso di questa terapia è facilmente monitorabile con tecniche e test convenzionali.

VII. Kit e articoli di fabbricazione

Sono inoltre disponibili kit, dosi unitarie e articoli di fabbricazione contenenti uno qualsiasi dei recettori antigenici chimerici o delle cellule effettrici immunitarie ingegnerizzate dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, viene fornito un kit che contiene una qualsiasi delle composizioni farmaceutiche dell'invenzione e, preferibilmente, le istruzioni per il suo utilizzo.

I kit della presente invenzione sono contenuti in confezioni adeguate. Le confezioni adatte includono, ma non solo, fiale, flaconi, barattoli, confezioni flessibili (*ad esempio*, sacchetti di Mylar o di plastica sigillati) e simili. I kit possono facoltativamente prevedere componenti aggiuntivi come tamponi e informazioni interpretative. La presente invenzione fornisce quindi anche articoli di fabbricazione, tra cui fiale (ad esempio fiale sigillate), flaconi, barattoli, confezioni flessibili e simili.

L'articolo di fabbricazione può comprendere un contenitore e un'etichetta o un foglietto illustrativo sul contenitore o associato ad esso. I contenitori

adatti includono, ad esempio, flaconi, fiale, siringhe, *eccetera*. I contenitori possono essere realizzati in diversi materiali, come vetro o plastica. In genere, il contenitore contiene una composizione efficace per il trattamento di una malattia o di un disturbo (come il cancro) qui descritto e può avere una luce di accesso sterile (ad esempio, il contenitore può essere una sacca per soluzioni endovenose o una fiala con un tappo perforabile da un ago da iniezione ipodermica). L'etichetta o il foglietto illustrativo indicano che la composizione è utilizzata per il trattamento di una particolare condizione in un individuo. L'etichetta o il foglietto illustrativo contengono anche le istruzioni per la somministrazione della composizione all'individuo. L'etichetta può indicare le istruzioni per la ricostituzione e/o l'uso. Il contenitore che contiene la composizione farmaceutica può essere un flacone multiuso, che consente somministrazioni ripetute (*ad esempio* da 2 a 6 somministrazioni) della formulazione ricostituita. Per foglietto illustrativo si intendono le istruzioni abitualmente incluse nelle confezioni commerciali di prodotti terapeutici che contengono informazioni sulle indicazioni, l'uso, la posologia, la somministrazione, le controindicazioni e/o le avvertenze relative all'uso di tali prodotti terapeutici. Inoltre, l'articolo di fabbricazione può comprendere un secondo contenitore contenente un tampone farmaceuticamente accettabile, come l'acqua batteriostatica per iniezione (BWFI), la soluzione fisiologica tamponata con fosfati, la soluzione di Ringer e la soluzione di destrosio. Può inoltre includere altri materiali desiderabili dal punto di vista commerciale e degli utenti, tra cui altri tamponi, diluenti, filtri, aghi e siringhe.

I kit o gli articoli di fabbricazione possono includere dosi unitarie multiple della composizione farmaceutica e istruzioni per l'uso, confezionate in quantità sufficienti per la conservazione e l'uso in farmacia, ad esempio nelle farmacie ospedaliere e nelle farmacie di composizione.

Gli esempi che seguono sono da intendersi come puramente esemplificativi dell'invenzione e non devono quindi essere considerati come una limitazione dell'invenzione stessa. Gli esempi e la descrizione dettagliata che seguono sono forniti a titolo illustrativo e non limitativo.

ESEMPI

Gli esempi qui descritti non intendono rappresentare che gli esperimenti di seguito riportati siano tutti o gli unici eseguiti. Sono stati compiuti sforzi per garantire l'accuratezza dei numeri utilizzati (ad esempio, quantità, temperatura, eccetera), ma è necessario tenere conto di alcuni errori e deviazioni sperimentali. Se non diversamente indicato, le parti sono parti in peso, il peso molecolare è il peso molecolare medio, la temperatura è espressa in gradi centigradi e la pressione è quella atmosferica o quasi.

Esempio 1. Preparazione di anticorpi a dominio singolo

Per sviluppare anticorpi a dominio singolo con elevata affinità di legame con antigeni specifici, sono stati immunizzati dei lama ed è stata costruita una libreria di phage-display per identificare i lead V_{HH} . I cloni distinti sono stati scelti a caso e sono stati classificati in base alla regione 3 di determinazione della complementarità della catena pesante (CDR3), una regione che può svolgere un ruolo importante nel legame con l'antigene.

Per ottenere gli anticorpi a dominio singolo, i lama sono stati immunizzati regolarmente con i rispettivi immunogeni, che possono includere la proteina ricombinante BCMA umana con un tag Fc terminale C (ACRO Biosystems, Cat No.:BC7-H5254), la proteina ricombinante CD38 umana con un tag His terminale C (ACRO Biosystems, Cat No: CD8-H5224), proteina CD19 umana ricombinante con tag Fc terminale C (ACRO Biosystems, Cat No.:CD9-H5229) e proteina CD20 umana ricombinante con tag Fc terminale C (ACRO Biosystems, Cat No: CD0-H526a).

Di seguito viene descritto un processo di generazione di anticorpi a dominio singolo anti-BCMA come esempio di generazione di anticorpi a dominio singolo contro vari antigeni. La generazione di anticorpi anti-CD38 umano, anti-CD19 umano e anti-CD20 a dominio singolo è stata eseguita con processi simili a quelli descritti di seguito. Sono stati descritti altri protocolli per la preparazione di anticorpi a dominio singolo. Vedere, ad esempio, Els Pardon et al, *Nature Protocol*, 2014; 9(3): 674.

1. Immunizzazione degli animali e test di risposta immunitaria

1.1 Immunizzazione degli animali

Ogni immunogeno comprendente una proteina antigenica ricombinante è stato miscelato con adiuvante o PBS e iniettato in un lama. Gli animali sono stati immunizzati dal fornitore di servizi (Cedarline) per sette volte, in genere con 200 µg di immunogeno e CFA (Complete Freund's Adjuvant) ogni volta a intervalli di circa 1 settimana - 2 settimane. I campioni di sangue periferico sono stati raccolti nella fase di pre-immunizzazione e dopo la quinta e settima immunizzazione. Dopo diversi cicli di immunizzazione, le reazioni immunitarie dei lama contro l'antigene target sono state valutate per confermare il titolo degli anticorpi monodominio specifici per l'antigene. I linfociti sono stati isolati mediante centrifugazione a gradiente da circa 100 ml di sangue periferico. Le cellule sono state integrate con RNALATER™ e conservate a -80°C. I sieri sono stati ottenuti mediante centrifugazione di campioni di sangue anticoagulato e conservati a -80°C.

1.2 Frazionamento di IgG

Il frazionamento della sottoclasse IgG è stato eseguito secondo la procedura operativa standard di GenScript. Le sottoclassi di IgG sono state frazionate dal siero dell'emorragia terminale utilizzando resine di Proteina G e di Proteina A. Il campione di siero da 1 ml è stato caricato su una colonna HITRAP® Protein G HP da 1 ml e la colonna è stata lavata con 10 ml di tampone fosfato (20 mM, pH 7,0). La frazione IgG3 (MW 100.000 Da) è stata eluita con 0,15 M NaCl, 0,58% di acido acetico (pH 3,5) e l'eluato è stato neutralizzato con 1 M Tris-HCl (pH 9,0) fino a pH 7,4. Successivamente, la frazione di IgG1 (MW 170.000 Da) è stata eluita con glicina-HCl 0,1 M (pH 2,7) e l'eluato è stato neutralizzato con Tris-HCl 1 M (pH 8,5) fino a pH 7,4. Il flusso della colonna HITRAP® Protein G HP è stato quindi caricato su una colonna HITRAP® Protein A HP da 1 ml e la colonna è stata lavata con 20 ml di tampone fosfato (20 mM, pH 7,0). La frazione IgG2 (MW 100.000 Da) è stata eluita con 0,15 M NaCl, 0,58% acido acetico (pH

4,5), e l'eluato è stato neutralizzato con 1M Tris-HCl (pH 9,0) a pH 7,4. Le concentrazioni degli anticorpi IgG1, IgG2 e IgG3 purificati sono state determinate mediante OD280 e la purezza di ciascuno è stata valutata mediante analisi SDS-PAGE riducente e non riducente.

1.3 Saggio di risposta immunitaria

La risposta immunitaria dei lama è stata valutata mediante ELISA, in cui i campioni di siero e le IgG purificate sono stati analizzati per verificare il legame con immunogeni immobilizzati. Sono stati valutati i sieri raccolti prima dell'immunizzazione, dopo la quinta immunizzazione e al momento dell'emorragia terminale. L'antigene (*vale a dire* la proteina ricombinante dell'antigene umano) è stato diluito nel tampone di rivestimento a 4 µg/ml. La piastra per microtitolazione è stata rivestita con l'antigene diluito a 4°C per una notte. La piastra è stata quindi lavata 3 volte con il tampone di lavaggio e poi bloccata a temperatura ambiente per 2 ore. La piastra è stata successivamente lavata 4 volte con tampone di lavaggio. Una serie di sieri o IgG diluiti è stata aggiunta alla piastra e incubata a temperatura ambiente per 1,5 ore. La piastra è stata quindi lavata 4 volte con il tampone di lavaggio. L'anticorpo secondario anti-lama IgG coniugato con HRP è stato aggiunto alla piastra e incubato a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo il lavaggio, il substrato TMB è stato aggiunto a ciascun pozzetto e incubato per 10 minuti prima di essere fermato con 1 M HCl. Per quantificare il legame, l'assorbanza a 450 nm è stata misurata per ogni pozzetto utilizzando uno spettrometro MK3.

2. Costruzione della libreria di visualizzazione fago V_HH

2.1 Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto dai linfociti isolati (da 1.1.1) utilizzando TRIZOL® Reagent secondo il protocollo del produttore. La quantità e la qualità dell'RNA totale sono state valutate tramite elettroforesi su gel e quantificate misurando l'assorbanza a OD260/280.

2.2 RT-PCR e amplificazione V_HH

L'RNA totale è stato trascritto in reverse cDNA con un primer oligo(dT)₂₀ utilizzando PRIMESCRIPT™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit secondo il protocollo del produttore. Per amplificare i frammenti V_HH sono stati disegnati sei primer degenerati specifici in avanti e due inversi, nei quali sono stati introdotti due siti di restrizione BglI. I frammenti V_HH sono stati amplificati secondo la procedura operativa standard (SOP) di GenScript, come descritto di seguito.

Le regioni variabili delle immunoglobuline a catena pesante (*vale a dire* V_HH) sono state amplificate utilizzando una reazione a catena della polimerasi (PCR) in due fasi. Nella prima PCR, 100 ng di modello di cDNA sono stati miscelati con i primer CALL001 (SEQ ID NO: 229) e CALL002 (SEQ ID NO: 230). I prodotti di DNA della prima reazione di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio. Dopo la purificazione su gel, i prodotti di DNA della prima PCR sono stati utilizzati come template nella seconda PCR. La seconda PCR è stata eseguita con i primer BACK-

1 (SEQ ID NO: 231), BACK-2 (SEQ ID NO: 232) e PMCF (SEQ ID NO: 233). I prodotti di seconda PCR amplificati contenenti frammenti di PCR $V_{H}H$ sono stati purificati in gel e digeriti enzimaticamente, quindi inseriti in plasmidi fagemidici. I plasmidi ricombinanti con i frammenti del gene $V_{H}H$ sono stati elettro-trasferiti in cellule *E.coli* per generare la libreria immunitaria $V_{H}H$ a visualizzazione fagica.

La procedura della reazione di PCR prevede una fase iniziale di denaturazione a 94°C per 7 minuti, seguita da 30 cicli di 94°C per 1 minuto, 55°C per 1 minuto e 72°C per 1 minuto e da una fase finale di estensione a 72°C per 7 minuti.

2.3 Costruzione di librerie di fagi

I prodotti PCR $V_{H}H$ sono stati ottenuti mediante amplificazione con diverse coppie di primer. I prodotti di PCR sono stati poi digeriti con BgII e purificati in gel. I frammenti purificati su gel sono stati inseriti nel vettore fagemidico interno di GenScript. È stata costruita una libreria pilota per ottimizzare le condizioni di ligazione e trasformazione. Le condizioni di ligazione e trasformazione ottimizzate sono state impiegate per sviluppare la libreria di fagemidi. Una piccola porzione delle cellule trasformate è stata diluita e sparsa su piastre 2×YT integrate con 100 µg/ml di ampicillina. Le colonie sono state contate per calcolare la dimensione della libreria. I cloni positivi sono stati prelevati a caso e sequenziati per valutare la qualità della libreria. Il resto delle cellule trasformate è stato strisciato su piastre YT integrate con 100 µg/ml di ampicillina e 2% di glucosio. I prati delle colonie sono stati raschiati dalle piastre. Una piccola aliquota di cellule è stata utilizzata per l'isolamento dei plasmidi della libreria. Il resto è stato integrato con glicerolo e conservato a -80°C come scorta.

3. Panning della visualizzazione dei fagi

3.1 Bio-panning

La libreria fagica $V_{H}H$ costruita è stata analizzata rispettivamente contro la proteina BCMA umana ricombinante e contro cellule CHO che esprimono il BCMA umano (*vale a dire* cellule CHO-BCMA, preparate internamente da Legend Biotec) utilizzando una procedura standard sviluppata da GenScript. Lo stock di libreria è stato fatto crescere fino alla fase log, quindi la libreria è stata salvata con il fago helper M13KO7 ed è stata amplificata per una notte a 25°C in un agitatore. Il fago è stato poi precipitato con PEG/NaCl, risospeso in PBS e conservato a -80°C. Per il panning in fase solida, i pozzetti della micropiastra sono stati rivestiti con la proteina BCMA umana ricombinante in PBS a 4°C per una notte. Per il panning in fase liquida, le cellule CHO-BCMA sono state bloccate con tampone bloccante a temperatura ambiente per 1 ora. Durante la fase di rivestimento o blocco, le particelle fagiche sono state pre-incubate con il tampone di blocco e la proteina di controllo Fc nei pozzetti della micropiastra. Dopo la pre-incubazione, le particelle fagiche sono state aggiunte ai pozzetti rivestiti rispettivamente con le proteine BCMA o con la soluzione CHO-BCMA e incubate per 1 ora. Dopo l'incubazione, i fagi non legati e non specifici sono stati lavati risciacquando i pozzetti o le cellule CHO-BCMA con PBST

per sei volte e due ulteriori lavaggi con PBS. Le particelle fagiche legate sono state eluite con 100 mM di trietilammina (TEA) e l'eluato è stato neutralizzato con 1 M di Tris-HCl (pH 7,4). Metà dell'eluato è stato poi utilizzato per infettare cellule di *E. coli* TG1 a crescita ($OD_{600} = 0,4\sim 0,6$) per la titolazione in uscita.

3.2 Phage ELISA

Per identificare i cloni specifici per gli antigeni target è stato eseguito il Phage ELISA. I singoli cloni di fagi in uscita sono stati coltivati in piastre a 96 pozzetti e salvati da fagi helper M13KO7 per una notte. Per identificare i cloni che si legano alle proteine dell'antigene, le piastre per microtitolazione ELISA a 96 pozzetti sono state rivestite rispettivamente con la proteina BCMA umana ricombinante e con la proteina Fc di controllo in un tampone di rivestimento per una notte a 4°C; le piastre sono state poi bloccate con un tampone bloccante. Dopo il blocco, sono stati aggiunti alle piastre circa 50 µl per pozzetto di surnatante fagico dalla coltura cellulare overnight, per un'incubazione di 1,5 ore a 4°C. Le piastre sono state lavate quattro volte e l'anticorpo monoclonale anti-M13 coniugato con HRP è stato aggiunto alle piastre per 45 minuti di incubazione a 4°C. Le piastre sono state nuovamente lavate cinque volte e la soluzione di substrato è stata aggiunta alle piastre. Le piastre sono state nuovamente lavate cinque volte e la soluzione di substrato è stata aggiunta ai pozzetti per lo sviluppo. L'assorbimento a 450 nm è stato misurato per ciascun pozzetto.

Per identificare i cloni che legano le cellule CHO-BCMA, le cellule CHO-BCMA sono state bloccate con tampone bloccante a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo il blocco, alle soluzioni cellulari sono stati aggiunti circa 20 µl per pozzetto di surnatante fagico dalla coltura cellulare overnight per un'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente. Dopo aver lavato le cellule 4 volte, è stato aggiunto l'anticorpo monoclonale anti-M13 coniugato con HRP per 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente. Le cellule sono state lavate cinque volte e quindi è stata aggiunta la soluzione di substrato per lo sviluppo. L'assorbimento è stato misurato a 450 nm.

Dopo il panning, i cloni singoli positivi al test ELISA sui fagi sono stati selezionati a caso e il DNA è stato preparato dai fagi in uscita utilizzando kit di estrazione plasmidica. Gli inserti nei plasmidi sono stati sequenziati. Per ogni antigene target sono state ottenute una o più sequenze V_{HH} vedere, ad esempio, la Tabella 2.

Esempio 2. Preparazione dei Recettori Antigenici Chimerici V_{HH} Monospecifici

Una sequenza backbone CAR che codifica un polipeptide backbone CAR comprendente dal terminale N al terminale C: un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD28, un dominio citoplasmatico CD28, un dominio citoplasmatico CD137 e un dominio citoplasmatico CD3 ζ sono stati sintetizzati chimicamente e clonati in un vettore lentivirale pre-modificato a valle e operativamente legato a un promotore costitutivo hEF1 α . Il vettore backbone CAR risultante è stato denominato "PLLV-hEF1 α -8281373" I siti di multi-clonazione (MCS) nel vettore hanno permesso l'inserimento di

una sequenza di acido nucleico comprendente una sequenza di Kozak (SEQ ID NO: 126) legata operativamente a una sequenza di acido nucleico che codifica un peptide segnale CD8 α fuso con il terminale N di un frammento V_HH nel vettore PLLV-hEF1 α -8281373, a monte e legata operativamente alla sequenza backbone CAR.

Per costruire un CAR monospecifica con un dominio singolo V_HH utilizzando il backbone PLLV-hEF1 α -8281373, la sequenza di acido nucleico che codifica il dominio V_HH è stata operativamente legata al 3' della sequenza di acido nucleico che codifica il peptide segnale CD8 α . La sequenza di acido nucleico di fusione è stata sintetizzata chimicamente e clonata nel backbone di PLLV-hEF1 α -8281373 CAR tramite EcoRI (SEQ ID NO: 234: 5'-GAATTC-3') e SpeI (SEQ ID NO:235: 5'-ACTAGT-3') mediante tecniche di clonazione molecolare note nella tecnica. La Tabella 4 elenca i vettori costruiti per esprimere i CAR monospecifici e monovalenti anti-BCMA e anti-CD38.

Per facilitare l'inserimento di sequenze aggiuntive, come un nucleotide che codifica un secondo V_HH, quando si progetta un costrutto CAR monospecifico (*ad esempio*, anti-BCMA o anti-CD38), i siti di restrizione includono HpaI (SEQ ID NO: 236: 5'-GTTAAC-3'), MluI (SEQ ID NO: 237: 5'-ACGCGT-3'), NsiI (SEQ ID NO: 238: 5'-ATGCAT-3') sono stati inclusi tra la sequenza di acido nucleico del peptide segnale CD8 α e la sequenza di acido nucleico V_HH.

La miscela di plasmidi per il confezionamento dei lentivirus, comprendente pCMV- Δ R-8.74 e pMD2.G (Addgene#12259), è stata premiscelata con i vettori PLLV-hEF1 α -8281373 aventi frammenti V_HH (Tabella 4) in un rapporto pre-ottimizzato con polietereimmide (PEI), quindi miscelata correttamente e incubata a temperatura ambiente per 5 minuti. La miscela di trasfezione è stata quindi aggiunta a goccia alle cellule HEK293 e mescolata delicatamente. Successivamente, le cellule sono state incubate per una notte in un incubatore a 37°C e 5% di CO₂. I surnatanti sono stati raccolti dopo centrifugazione a 4°C, 500 g per 10 min.

I surnatanti contenenti il virus sono stati filtrati attraverso un filtro PES da 0,45 μ m, seguito da ultra-centrifugazione per la concentrazione dei lentivirus. Dopo l'ultracentrifugazione, il surnatante è stato accuratamente scartato e i pellet di virus sono stati risciacquati con cautela con DPBS pre-raffreddato. Il virus è stato opportunamente aliquotato e poi conservato immediatamente a -80°C. Il titolo del virus è stato determinato mediante p24 sulla base del kit HTRF sviluppato da GenScript.

Preparazione delle PBMC

I leucociti sono stati raccolti da donatori sani mediante aferesi e la concentrazione cellulare è stata regolata a 5 \times 10⁶ cellule /ml in terreno R10. I leucociti sono stati poi mescolati con una soluzione di NaCl allo 0,9% in rapporto 1:1 (v/v). 3 ml di terreno per linfopreparazione sono stati aggiunti a una provetta da centrifuga da 15 ml e 6 ml di miscela di linfociti diluiti sono stati lentamente stratificati sopra il terreno per linfopreparazione. La

miscela di linfociti è stata centrifugata a 800 g per 30 minuti senza freni a 20°C. Il buffy coat dei linfociti è stato quindi raccolto con una pipetta da 200 µl. La frazione raccolta è stata diluita almeno 6 volte con NaCl 0,9% o R10 per ridurre la densità della soluzione. La frazione raccolta è stata poi centrifugata a 250 g per 10 minuti a 20°C. Il surnatante è stato aspirato completamente e 10 ml di R10 sono stati aggiunti al pellet cellulare per risospenderlo. La miscela è stata ulteriormente centrifugata a 250 g per 10 minuti a 20°C. Il surnatante è stato nuovamente aspirato. 2 ml di R10 preriscaldato a 37°C con 100 IU/ml di IL-2 sono stati aggiunti al pellet cellulare, che è stato risospeso dolcemente. Il numero di cellule è stato determinato dopo la colorazione Trypan Blue e questo campione di PBMC era pronto per gli esperimenti successivi.

Purificazione delle cellule T

Le cellule T umane sono state purificate da PBMC utilizzando il kit di isolamento delle cellule T Miltenyi Pan (Cat#130-096-535), seguendo il protocollo del produttore come descritto di seguito. Il numero di cellule è stato prima determinato e la sospensione cellulare è stata centrifugata a 300 g per 10 minuti. Il surnatante è stato quindi aspirato completamente e il pellet cellulare è stato risospeso in 40 µl di tampone per 10⁷ cellule totali. Sono stati aggiunti 10 µl di Pan T Cell Biotin-Antibody Cocktail per 10⁷ cellule totali, mescolati accuratamente e incubati per circa 5 minuti in frigorifero (2~8°C). Sono stati quindi aggiunti 30 µl di tampone per 10⁷ cellule. Sono stati aggiunti 20 µl di Pan T Cell MicroBead Cocktail per 10⁷ cellule. La miscela di sospensione cellulare è stata mescolata bene e incubata per altri 10 minuti in frigorifero (2~8°C). Per la separazione magnetica è necessario un minimo di 500 µl. Per la separazione magnetica, una colonna LS è stata posta nel campo magnetico di un separatore MACS adatto. La colonna è stata preparata risciacquando con 3 ml di tampone. La sospensione cellulare è stata quindi applicata alla colonna e il flusso contenente le cellule non marcate è stato raccolto, rappresentando le frazioni di cellule T arricchite. Ulteriori cellule T sono state raccolte lavando la colonna con 3 ml di tampone e raccogliendo le cellule non marcate che passano attraverso. Queste cellule non marcate rappresentano nuovamente le cellule T arricchite e sono state combinate con il flusso della fase precedente. I linfociti T arricchiti in pool sono stati poi centrifugati e risospesi in R10+100 IU/ml di IL-2.

Le cellule T preparate sono state successivamente pre-attivate per 48-96 ore con il kit di attivazione/espansione delle cellule T umane (Miltenyi#130-091-441) secondo il protocollo del produttore, al quale sono state aggiunte particelle MACSiBead anti-CD3/CD28 in un rapporto microsfere-cellule di 1:2.

Le cellule T pre-attivate sono state trasdotte con stock di lentivirus in presenza di 7 µg/ml di polibrene con centrifugazione a 1200 g, 32°C per 1,5 h.

Le cellule trasdotte sono state poi trasferite nell'incubatore di coltura cellulare per l'espressione del transgene in condizioni adeguate.

Il giorno 3 o il giorno 7 dopo la trasduzione, le cellule T trasdotte sono state raccolte e co-incubate con cellule tumorali in un rapporto tra cellule

effettrici (CAR-T) e cellule target di 20:1 per 20 ore. Le cellule target sono state la linea cellulare di mieloma multiplo umano RPMI8226.Luc o la linea cellulare di glioblastoma umano U87MG.Luc, entrambe le linee cellulari ingegnerizzate in casa per esprimere la luciferasi di lucciola. Per valutare la citotossicità dei CAR-T sulle cellule tumorali, i reagenti per il test della luciferasi One-glo luminescente (Promega#E6110) sono stati preparati secondo il protocollo del produttore e aggiunti alle cellule in co-coltura per rilevare l'attività luciferasica residua nel pozzetto. Poiché la luciferasi è espressa solo nelle cellule RPMI8226.Luc o U87MG.Luc, l'attività della luciferasi rimanente nel pozzetto è direttamente correlata al numero di cellule target vitali nel pozzetto. L'attività massima della luciferasi è stata ottenuta aggiungendo il terreno di coltura alle cellule target in assenza di cellule effettrici. L'attività minima della luciferasi è stata determinata aggiungendo Triton X-100 a una concentrazione finale dell'1% al momento dell'avvio dei saggi di citotossicità. La citotossicità specifica è stata calcolata con la formula: Citotossicità specifica % = 100% * (1- (RLUcampione-RLUmin)/(RLUmax-RLUmin)).

I cloni CAR monospecifici che hanno come target il BCMA (CD269) sono stati codificati iniziando con le cifre "269", mentre i cloni CAR monospecifici che hanno come target il CD38 sono stati codificati in modo analogo iniziando con le cifre "38". Come mostrato nella FIGURA 2A, i cloni selezionati hanno mostrato diversi livelli di citotossicità sulle cellule di mieloma multiplo RPMI8226.Luc, con oltre il 60% di CAR-T monospecifiche basate su V_HH che hanno mostrato una citotossicità >50% contro le cellule RPMI8226.Luc. I cloni 269A37346, 269A37348, 269A37353, 269A37355, 38A37326, 38A37331, 38A37717 e 38A37719 basati su CAR-T sono stati selezionati per ulteriori test. In particolare, i cloni 269A37346, 269A37348, 269A37353, 269A37355, 38A37326, 38A37331, 38A37717 a base di CAR-T hanno mostrato una potente citotossicità sulle cellule di mieloma multiplo della linea RPMI8226.Luc, con un aumento di oltre il 20%-30% dell'uccisione delle cellule RPMI8226.Luc con il trattamento CAR-T rispetto alle cellule T di controllo non trasdotte (UnT). Tuttavia, tale aumento di citotossicità non si è verificato sulle cellule di glioblastoma umano della linea U87MG.Luc (si veda la FIGURA 2B). Non sono stati rilevati effetti citotossici significativi su U87MG.Luc da parte di queste cellule CAR-T monospecifiche basate su V_HH rispetto ai controlli UnT. L'osservazione di cui sopra indica che alcuni di questi cloni potrebbero essere specifici per il target e potenti sulle cellule BCMA o CD38 positive.

Esempio 3. Preparazione di recettori antigenici chimerici bispecifici o multivalenti esemplificativi

I cloni potenzialmente potenti descritti nell'Esempio 2 potrebbero anche essere candidati favorevoli per la generazione di CAR bispecifici o multivalenti basati su V_HH. Due cloni V_HH rappresentativi (clone V_HH anti-BCMA 269A37346 e clone V_HH anti-CD38 38A37717) sono stati selezionati per costruire vari costrutti CAR esemplificativi.

I CAR basati su V_HH BCMA × CD38 possono essere generati combinando il V_HH specifico per il BCMA e il V_HH specifico per il CD38 attraverso

un opportuno linker peptidico (*ad esempio* un polimero Gly-Ser) seguito da un vettore backbone di dominio di segnale CAR. Esempi di costrutti CAR bispecifici BCMA×CD38 (da GSI5001 a GSI5010) sono riportati nella Tabella 6. In primo luogo, la sequenza amminoacidica dell'anti-BCMA V_HH e dell'anti-CD38 V_HH sono state collegate tra loro attraverso un linker Gly-Ser che poteva essere di lunghezza diversa. Quindi la sequenza amminoacidica collegata è stata collocata dopo la sequenza del peptide segnale del CD8 α . Questa sequenza combinata, che include il peptide di segnale Kozak-CD8 α e il V_HH bispecifico, è stata sintetizzata direttamente e clonata in un backbone PLLV-hEF1 α -81373 CAR attraverso i siti di restrizione EcoRI e SpeI, con i normali protocolli di clonaggio molecolare noti nella tecnica. La sequenza CAR backbone codifica un polipeptide CAR backbone che comprende dal terminale N al terminale C: un dominio cerniera CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α , un dominio citoplasmatico CD137 e un dominio citoplasmatico CD3 ζ sono stati sintetizzati chimicamente e clonati in un vettore lentivirale pre-modificato a valle e collegato operativamente a un promotore costitutivo hEF1 α . Il vettore backbone CAR risultante è stato denominato "PLLV-hEF1 α -81373"

Inoltre, un vettore di co-espressione esemplificativo che codifica CAR BCMA e CAR CD38 è stato costruito combinando il V_HH CAR specifico per BCMA e il V_HH CAR specifico per CD38 in un singolo vettore CAR attraverso un linker basato su splicing adatto (T2A, P2A o F2A). Ad esempio, il costrutto GSI5013 ha una sequenza di acido nucleico pari a SEQ ID NO: 239. La sequenza di acido nucleico in GSI5013 codifica dal 5' al 3': Peptide segnale CD8 α , 38A37717 V_HH, dominio cerniera CD8 α , dominio transmembrana CD8 α , dominio co-stimolatorio CD137, dominio di segnalazione citoplasmatica CD3 ζ , T2A, peptide segnale CD8 α , 269A37346 V_HH, dominio cerniera CD8 α , dominio transmembrana CD8 α , dominio co-stimolatorio CD137 e dominio di segnalazione citoplasmatica CD3 ζ .

I CAR V_HH multivalenti possono essere costruiti introducendo una sequenza di acidi nucleici che codifica copie multiple di un singolo V_HH fuse tra loro da linker peptidici in un vettore backbone del dominio di segnale CAR. Esempi di costrutti CAR monovalenti e multivalenti (GSI5014, GSI5015, GSI5016, GSI5017) sono elencati nella Tabella 5. Questi costrutti sono stati preparati collegando 2-3 copie di V_HH mediante un linker glicina-serina, seguito dalla sintesi diretta di questa sequenza collegata in combinazione con la sequenza di acido nucleico del peptide segnale di Kozak-CD8 α e dal clonaggio nel backbone di PLLV-hEF1 α -81373 CAR attraverso i siti di restrizione EcoRI e SpeI. Come controlli, anche V_HH in copia singola sono stati clonati nello stesso backbone PLLV-hEF1 α -81373 CAR con metodi identici (GSI5011 e GSI5012, elencati nella Tabella 4).

I vettori lentivirali che recano i geni CAR da GSI5001 a GSI5017 sono stati confezionati e titolati con i protocolli descritti nell'Esempio 2. Utilizzando i protocolli descritti nell'Esempio 2, sono stati preparati PBMC umani da sangue periferico di volontari per l'ulteriore isolamento di cellule T umane primarie utilizzando i kit di isolamento delle cellule PanT umane Miltenyi. I linfociti T purificati sono stati pre-attivati ed espansi utilizzando microsferi Miltenyi anti-CD3/CD28 come descritto nell'Esempio 2. Le cellule T pre-attivate sono state poi trasdotte con stock di lentivirus in presenza

di 7 µg/ml di polibrene mediante centrifugazione a 1200 g, 32°C per 1,5 h. Le cellule trasdotte sono state poi trasferite nell'incubatore di coltura cellulare per l'espressione del transgene in condizioni adeguate.

Il giorno 3 dopo la trasduzione, le cellule T trasdotte sono state raccolte e co-incubate con cellule tumorali tra cellule effettrici (CAR-T) e cellule target in un rapporto di 20: 1 per 20 ore. Per valutare la citotossicità delle CAR-T sulle cellule tumorali, i reagenti One-glo luminescent luciferase assay (Promega#E6110) sono stati aggiunti alle cellule co-coltivate e la citotossicità specifica per ciascuna CAR-T è stata misurata come descritto nell'Esempio 2.

Il numero di copie dei geni CAR integrati per ciascun gruppo è stato determinato mediante un saggio di PCR semiquantitativa (q-PCR). In breve, il DNA genomico di ciascun gruppo di CAR-T è stato preparato con Genra Puregene Cell Kit (Qiagen). La concentrazione di DNA genomico è stata determinata mediante Nanodrop e 10 ng di campione di DNA genomico sono stati processati per un saggio q-PCR standardizzato con SYBR Green Realtime PCR Master mix plus (Toyobo) su strumento ABI#7300 q-PCR utilizzando primer specifici per CAR (primer forward 137P2F (SEQ ID NO: 252): 5'-GTCCTTCTCCTGTCCTGTTAT-3'; e il primer inverso 137P2R (SEQ ID NO: 253): 5'-TCTTCTTCTTCTGGAAATCGGCA-3'). Il numero relativo di copie di ciascun gene CAR integrato è stato calcolato sulla base di una curva standard stabilita utilizzando plasmidi contenenti sequenze target.

Come mostrato nella Tabella 7, sono stati determinati i numeri di copie per ogni preparazione CAR-T e i dati suggeriscono un'elevata integrazione del gene target nel genoma delle cellule T.

TABELLA 7. Numeri di copie dell'integrazione del genoma.

Cellule CAR-T con costrutti	Copie/ng gDNA
GSI5001	18257060
GSI5002	15105810
GSI5003	17307510
GSI5004	2735165
GSI5005	Non processato
GSI5006	6692277
GSI5007	6929693
GSI5008	15549250
GSI5009	10602720
GSI5010	7353348
GSI5011	3089537
GSI5012	650551,3
GSS005	1070972
GSI005	321521
UnT	72,77
acqua	117

Come illustrato nelle FIGURE 3A-3B, V_HH CAR monospecifico contro BCMA (GSI5011) e V_HH CAR monospecifico contro CD38 (GSI5012)

hanno mostrato una potente citotossicità sulla linea cellulare di mieloma multiplo RPMI8226.Luc. Con GSI5011 CAR, sono stati lisati il $42,98 \pm 2,86\%$ delle cellule RPMI8226.Luc e con GSI5012 il $61,25 \pm 1,92\%$ delle cellule RPMI8226.Luc, rispetto alla lisi non specifica da parte delle cellule T di controllo non trasdotte (UnT, $9,25 \pm 1,11\%$).

I CAR bispecifici GSI5001-GSI5010 hanno prodotto una potente lisi specifica della linea cellulare di mieloma multiplo RPMI8226.Luc rispetto alle cellule T di controllo non trasdotte (UnT). Come mostrato nelle FIGURE 3A e 3B, la percentuale specifica di lisi delle cellule RPMI8226.Luc è stata del $98,91 \pm 0,17\%$ per le cellule CAR-T che esprimono GSI5001, del $97,10 \pm 0,26\%$ per le cellule CAR-T che esprimono GSI5002, del $93,85 \pm 0,69\%$ per le cellule CAR-T che esprimono GSI5003, del $82,81 \pm 2,40\%$ per le cellule CAR-T che esprimono GSI5004, del $98,95 \pm 0,66\%$ per le cellule CAR-T che esprimono GSI5005, del $93,91 \pm 1,25\%$ per le cellule CAR-T che esprimono GSI5006, $96,49 \pm 1,05\%$ per le cellule CAR-T che esprimono GSI5007, $94,41 \pm 0,75\%$ per le cellule CAR-T che esprimono GSI5008, $90,72 \pm 0,62\%$ per le cellule CAR-T che esprimono GSI5009 e $85,05 \pm 2,69\%$ per le cellule CAR-T che esprimono GSI5010, rispetto alla lisi non specifica da parte delle cellule T di controllo non trasdotte (UnT, $9,25 \pm 1,11\%$).

Questi risultati hanno anche implicato che il linker Gly-Ser più corto sembrava mostrare prestazioni citotossiche leggermente migliori sulle cellule tumorali target. Ulteriori studi potrebbero essere condotti in condizioni di dosaggio non ottimali per studiare tali effetti. Inoltre, l'ordine dei V_HH anti-BCMA e anti-CD38 nel vettore non ha mostrato un'influenza significativa sulle prestazioni di citotossicità finale sulle cellule RPMI8226.Luc. Nel saggio sono state preparate anche due cellule CAR-T basate su scFv: GSS005 è un CAR basata su scFv anti-BCMA, mentre GSI005 è un CAR basata su scFv anti-CD38. Sia GSS005 che GSI005 hanno mostrato una potente lisi specifica anche contro le cellule RPMI8226.Luc ($57,94 \pm 1,91\%$ per GSS005, $61,25 \pm 1,92\%$ per GSI005).

Sono state preparate cellule T ingegnerizzate con BCMA-specifico CAR monovalente (GSI5011), BCMA-specifico CAR bivalente (GSI5012) o BCMA-specifico CAR trivalente (GSI5013) e cellule T ingegnerizzate con CD38-specifico CAR monovalente (GSI5012), CD38-specifico CAR bivalente (GSI5016) o CD38-specifico CAR trivalente (GSI5017) e sono stati eseguiti saggi di citotossicità su cellule RPMI8226.Luc come descritto sopra. Come mostrato nella FIGURA 4, la percentuale di lisi specifica delle cellule RPMI8226.Luc è stata del $63,25 \pm 2,64\%$ da parte delle cellule CAR-T che esprimono GSI5011, del $61,04 \pm 2,75\%$ da parte delle cellule CAR-T che esprimono GSI5014 e del $59,57 \pm 2,64\%$ da parte delle cellule CAR-T che esprimono GSI5015, rispetto allo $0,05 \pm 2,33\%$ delle cellule T di controllo non trasdotte (UnT). Inoltre, come illustrato nella FIGURA 4, la lisi specifica delle cellule RPMI8226.Luc da parte delle CAR-T anti-CD38 V_HH è stata del $95,79 \pm 0,62\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5012, del $94,16 \pm 0,31\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5016 e del $97,61 \pm 0,77\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5015, rispetto al $57,92 \pm 2,88\%$ delle cellule T di controllo non trasdotte (UnT). I dati suggeriscono che questi CAR con diverse modalità di legame con

l'antigene hanno una potente attività antitumorale contro le cellule BCMA positive.

Esempio 4. Preparazione, saggi *in vitro* e *in vivo* di un CAR CD19×CD20 esemplificativo

sdAb anti-CD19 e sdAb anti-CD20 esemplificativi sono stati ottenuti con procedure simili a quelle dell'Esempio 1. Questi anticorpi a dominio singolo sono elencati nella Tabella 2. I CAR CD19 monospecifici basati sul CD19 V_HH e i CAR CD20 monospecifici basati sul CD20 V_HH sono stati preparati come descritto nell'Esempio 2 ed elencati nella Tabella 4. Un CAR bispecifico CD19×CD20 esemplificativo basato sul V_HH CD19 e sul V_HH CD20 è stato costruito come descritto nell'Esempio 3 ed elencato nella Tabella 6. Il vettore backbone CAR utilizzato per la costruzione di CAR CD19, CAR CD20 e CAR CD19×CD20 esemplificativi codifica dal terminale N al terminale C: un peptide segnale di CD8 α , un dominio cerniera di CD8 α , un dominio transmembrana di CD28, un dominio citoplasmatico di CD28 e un dominio citoplasmatico di CD3 ζ . La FIGURA 5 mostra i costrutti del CAR CD19, del CAR CD20 e del CAR CD19×CD20 bispecifico. Le cellule CAR-T ingegnerizzate che esprimono il CAR CD19, il CAR CD20 o il CAR CD19×CD20 bispecifico sono state preparate come descritto nell'Esempio 2.

La citotossicità delle cellule CAR-T è stata determinata in un saggio di co-cultura di 4 ore. Negli esperimenti, le cellule CAR-T preparate sono state raccolte per centrifugazione, quindi diluite alle concentrazioni desiderate con DPBS con il 10% di siero umano AB e coltivate su piastre da 96 pozzetti. Le cellule tumorali Raji, note per la forte espressione di CD19 e CD20, sono state marcate con Calceina-AM (BD Biosciences). Le cellule CAR-T marcate e le cellule Raji sono state coltivate con un rapporto effettore/target di 10:1 a 37°C per 4 ore. Successivamente, la citotossicità delle cellule CAR-T è stata rilevata mediante FACS.

Come mostrato nella FIGURA 6, riquadro in alto a sinistra, non vi è stata una lisi significativa delle cellule Raji da parte delle cellule T non trasdotte. La citotossicità sulle cellule Raji è stata di circa il 40% sia da parte delle cellule V_HH CAR-T monospecifiche CD19 (39%, riquadro in alto a destra) che CD20 (41%, riquadro in basso a sinistra). Quando gli stessi CD19 V_HH e CD20 V_HH sono stati fusi per fungere da dominio extracellulare di legame con l'antigene nello stesso costrutto, *vale a dire* nelle cellule CAR-T bispecifiche CD19×CD20, la citotossicità delle cellule tumorali Raji (75,24%) è stata potenziata rispetto alle cellule CAR-T monospecifiche CD19 V_HH o CD20 V_HH (FIGURA 6, riquadro in basso a destra).

Studi su Modelli Tumorali di Topo

I topi NOG sono stati infusi con 4×10⁶ cellule Raji per topo mediante iniezione nella vena caudale. Dopo 10 giorni, i topi sono stati divisi uniformemente in quattro gruppi a caso, dove ogni gruppo è stato iniettato con dosi equivalenti di cellule T non trasdotte, cellule CAR-T CD19, cellule CAR-T CD20 o cellule CAR-T bispecifiche CD19×CD20, rispettivamente, e osservato ininterrottamente per 5 settimane.

Come mostrato nella FIGURA 7, i dati di sopravvivenza *in vivo* hanno suggerito che il tasso di sopravvivenza globale dei topi trattati con CAR

bispecifici CD19×CD20 era superiore a quello delle cellule CAR-T monospecifiche CD 19 o CD20.

Esempio 5. Preparazione di i CAR monospecifici e bivalenti esemplificativi con due diversi domini di legame per il BCMA

I potenziali cloni V_HH descritti nell'Esempio 2 potrebbero anche essere utilizzati per generare CAR monospecifici e multivalenti con due o più domini di legame al target diversi nel dominio extracellulare di legame con l'antigene. Due cloni rappresentativi di sdAb anti-BCMA (clone 269A37353 e clone 269A37917) sono stati selezionati per costruire vari costrutti CAR bivalenti monospecifici esemplificativi nel presente esempio.

I CAR bivalenti con target BCMA (*vale a dire* CAR bivalenti BCMA) possono essere generati fondendo due diversi domini V_HH specifici per il BCMA mediante un opportuno linker peptidico (*ad esempio*, un polimero Gly-Ser) e inserendo successivamente il costrutto di fusione in un vettore con dominio di segnale CAR. Esempi di costrutti CAR BCMA bivalenti (GSI5021-GSI5026) con due diversi domini di legame BCMA 269A37353 e 269A37917 sono elencati nella Tabella 5. Nei diversi costrutti sono stati utilizzati linker peptidici di varia lunghezza. I costrutti GSI5021-GSI5023 codificano ciascuno dal terminale N al terminale C: Peptide segnale di CD8 α , 269A37353, linker peptidico, 269A37917, cerniera di CD8 α , dominio transmembrana di CD8 α , dominio citoplasmatico di CD137 e dominio citoplasmatico di CD3 ζ umano. I costrutti GSI5024-GSI5026 codificano ciascuno dal terminale N al terminale C: Peptide segnale di CD8 α , 269A37917, linker peptidico, 269A37353, cerniera di CD8 α , dominio transmembrana di CD8 α , dominio citoplasmatico di CD137 e dominio citoplasmatico di CD3 ζ umano. Ogni costrutto è stato ulteriormente fuso con una sequenza Kozak al 5' per fornire la sequenza codificante completa. La sequenza codificante completa è stata sintetizzata direttamente e clonata in un backbone di PLLV-hEF1 α -81373 CAR attraverso i siti di restrizione EcoRI e SpeI utilizzando i comuni protocolli di clonazione molecolare noti nella tecnica. Al contrario, i CAR monovalenti monospecifiche (GSI5019 e GSI5020, elencate nella Tabella 4) con lo stesso backbone del dominio di segnale CAR sono stati costruiti con metodi simili.

I vettori lentivirali che recano ciascuno dei costrutti CAR GSI5019-GSI5026 sono stati confezionati e titolati con i protocolli descritti nell'Esempio 2. Utilizzando i protocolli descritti nell'Esempio 2, sono state preparate PBMC umane da campioni di sangue periferico di volontari per un ulteriore isolamento di cellule T umane primarie utilizzando i kit di isolamento delle cellule PanT umane Miltenyi. I linfociti T purificati sono stati pre-attivati ed espansi utilizzando microsfele Miltenyi anti-CD3/CD28 come descritto nell'Esempio 2.

Le cellule T pre-attivate sono state poi trasdotte con stock di lentivirus in presenza di 7 μ g/ml di polibrene mediante centrifugazione a 1200 g, 32°C per 1,5 h. Le cellule trasdotte sono state poi trasferite nell'incubatore di coltura cellulare per l'espressione del transgene in condizioni adeguate.

Il giorno 3 dopo la trasduzione, le cellule T trasdotte sono state raccolte e co-incubate con cellule tumorali (cellule RPMI8226.Luc o cellule U87MG.Luc) in un rapporto effettore (CAR-T)/cellula target di 20:1 per 20 ore. Le cellule RPMI8226.Luc sono cellule di mieloma multiplo che

esprimono luciferasi e sono positive al BCMA. Le cellule U87MG.Luc sono cellule di glioblastoma che esprimono luciferasi e sono BCMA negative. Per valutare la citotossicità dei CAR-T sulle cellule tumorali, i reagenti One-glo luminescent luciferase assay (Promega#E6110) sono stati aggiunti alle cellule co-coltivate e la citotossicità specifica per ciascuna CAR-T è stata misurata come descritto nell'Esempio 2.

Come mostrato nella FIGURA 8A, le percentuali specifiche di lisi delle cellule RPMI8226.Luc sono state $88,21 \pm 1,29\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5019, $93,84 \pm 1,13\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5020, $71,45 \pm 1,79\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5021, $99,80 \pm 0,45\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5022, $97,46 \pm 0,50\%$ da parte delle cellule CAR-T che esprimono GSI5023, $81,29 \pm 1,27\%$ da parte delle cellule CAR-T che esprimono GSI5024, $93,50 \pm 0,47\%$ da parte delle cellule CAR-T che esprimono GSI5025, $87,83 \pm 0,23\%$ da parte delle cellule CAR-T che esprimono GSI5026, rispettivamente, rispetto al $13,49\% \pm 1,75\%$ da parte delle cellule T di controllo non trasdotte (UnT). Inoltre, come illustrato nella FIGURA 8B, la percentuale specifica di lisi della linea cellulare BCMA-negativa U87MG.Luc è stata $2,84 \pm 7,41\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5019, $15,50 \pm 2,24\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5020, $6,74 \pm 3,37\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5021, $8,03 \pm 2,36\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5022, $9,00 \pm 1,88\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5023, $17,03 \pm 2,27\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5024, $16,81 \pm 1,98\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5025, $-11,55 \pm 5,43\%$ da parte delle cellule CAR-T esprimenti GSI5026, rispetto al $12,49\% \pm 3,79\%$ da parte delle cellule T di controllo non trasdotte (UnT). I dati suggeriscono che i CAR multivalenti con diverse modalità di legame con l'antigene hanno avuto una potente attività antitumorale contro le cellule BCMA positive, ma non contro le cellule BCMA negative.

RIVENDICAZIONI

1. Recettore antigenico chimerico (CAR) comprendente un polipeptide che comprende:
 - (a) un dominio extracellulare di legame con l'antigene che comprende un primo anticorpo a dominio singolo (sdAb) che si lega specificamente a un primo antigene e un secondo sdAb che si lega specificamente a un secondo antigene, in cui ciascuno tra il primo e il secondo sdAb è un V_HH;
 - (b) un dominio transmembrana; e
 - (c) un dominio di segnalazione intracellulare.
2. CAR secondo la rivendicazione 1, in cui il primo antigene e il secondo antigene sono selezionati dal gruppo costituito da CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 e glicolipide F77.
3. CAR secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il primo antigene è diverso dal secondo antigene.
4. CAR secondo la rivendicazione 3, in cui
 - (i) il primo sdAb è un sdAb anti-BCMA e il secondo sdAb è un sdAb anti-CD38;
 - (ii) il primo sdAb è un sdAb anti-BCMA e il secondo sdAb è un sdAb anti-CD19;
 - (iii) il primo sdAb è un sdAb anti-CD19 e il secondo sdAb è un sdAb anti-CD20; o
 - (iv) il primo sdAb è un sdAb anti-CD19 e il secondo sdAb è un sdAb anti-CD22.
5. CAR secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il primo antigene è identico al secondo antigene.
6. CAR secondo la rivendicazione 5, in cui il primo sdAb e il secondo sdAb si legano specificamente allo stesso epitopo.
7. CAR secondo la rivendicazione 5, in cui il primo sdAb e il secondo sdAb si legano specificamente ad epitopi diversi.
8. CAR secondo la rivendicazione 1, in cui il primo sdAb e/o il secondo sdAb è un sdAb anti-CD19 comprendente una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:1, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:3.
9. CAR secondo la rivendicazione 1, in cui il primo sdAb e/o il secondo sdAb è un sdAb anti-CD20 comprendente una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:4, una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:5 e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:6.
10. CAR secondo la rivendicazione 1, in cui il primo sdAb e/o il secondo sdAb è un sdAb anti-BCMA comprendente uno qualsiasi di quanto segue:

- (1) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:18; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:29;
- (2) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:8; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:19; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:30;
- (3) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:10; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:21; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:32;
- (4) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:22; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:33;
- (5) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:12; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:23; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:34;
- (6) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:13; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:24; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:35;
- (7) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:14; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:25; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:36;
- (8) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:15; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:26; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:37; o
- (9) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:17; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:28; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:39.

11. CAR secondo la rivendicazione 1, in cui il primo sdAb e/o il secondo sdAb è un sdAb anti-CD38 comprendente uno qualsiasi di quanto segue:

- (1) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:40; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:52; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:64;
- (2) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:41; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:53; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:65;
- (3) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:42; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:54; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:66;

(4) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:43; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:55; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:67;

(5) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:44; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:56; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:68;

(6) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:45; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:57; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:69;

(7) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:46; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:58; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:70;

(8) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:47; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:59; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:71;

(9) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:48; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:60; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:72;

(10) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:49; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:61; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:73;

(11) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:50; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:62; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:74; o

(12) una CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:51; una CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:63; e una CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:75.

12. CAR secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 11, in cui il primo sdAb è localizzato in corrispondenza del terminale N del secondo sdAb;

o

in cui il primo sdAb è localizzato in corrispondenza del terminale C del secondo sdAb.

13. CAR secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui il primo sdAb e/o il secondo sdAb sono camelidi, chimerici o umanizzati.

14. CAR secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 13, in cui il primo sdAb e il secondo sdAb sono direttamente fusi l'uno all'altro tramite un legame peptidico; o

in cui il primo sdAb e il secondo sdAb sono fusi l'uno all'altro tramite un linker peptidico, preferibilmente in cui il linker peptidico non è lungo più

di 50 amminoacidi.

15. CAR secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui

(i) il dominio transmembrana è derivato da una molecola selezionata dal gruppo costituito da CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 e PD1;

(ii) il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione intracellulare primario di una cellula effettrice immunitaria, in cui facoltativamente il dominio primario di segnalazione intracellulare è derivato da CD3 ζ ; e/o

(iii) il dominio di segnalazione intracellulare comprende un dominio di segnalazione co-stimolatoria, in cui facoltativamente il dominio di segnalazione co-stimolatoria è derivato da una molecola co-stimolatoria selezionata dal gruppo costituito da CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, ligandi di CD83 e loro combinazioni.

16. CAR secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 15, comprendente anche un dominio cerniera localizzato tra il terminale C del dominio extracellulare legante l'antigene e il terminale N del dominio transmembrana, e/o un peptide segnale localizzato in corrispondenza del terminale N del polipeptide.

17. CAR secondo la rivendicazione 1, in cui il CAR comprende una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO:200, 201 e 206-216.

18. Acido nucleico isolato che comprende una sequenza di acido nucleico che codifica il CAR secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 17.

19. Vettore comprendente l'acido nucleico isolato secondo la rivendicazione 18.

20. Cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata comprendente il CAR secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 17, l'acido nucleico isolato secondo la rivendicazione 18 o il vettore secondo la rivendicazione 19.

21. Cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata della rivendicazione 20, in cui la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata è una cellula T.

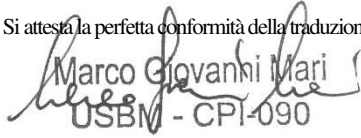
22. Composizione farmaceutica comprendente la cellula effettrice immunitaria ingegnerizzata secondo la rivendicazione 20 o 21, e un carrier farmaceuticamente accettabile.

23. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 22 da utilizzare in un metodo di trattamento del cancro in un individuo, in cui il primo antigene e il secondo antigene sono antigeni tumorali.

24. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 23, in cui il cancro è mieloma multiplo, leucemia linfoblastica acuta o leucemia linfocitica cronica.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

LEGENDA DELLE TAVOLE DI DISEGNO

TAVOLA 1/10

FIGURA 1A

"Exemplary sdAb: V_HH domain" = sdAb esemplificativo : Dominio V_HH

"Optional hinge domain" = Dominio cerniera facoltativo

"Transmembrane domain" = Dominio transmembrana

"Intracellular signaling domain" = Dominio di segnalazione intracellulare

FIGURA 1B

"Optional peptide linker" = Linker peptidico facoltativo

"Peptide linker" = Linker peptidico

TAVOLA 2/10

FIGURA 1C

"Different V_HH domains" = Domini V_HH diversi

"Optional peptide linker" = Linker peptidico facoltativo

"Antigene" = Antigene

TAVOLE 4, 10/10

FIGURE 2A, 8A

"Citotoxicity of on RPMI8226.Luc" = Citotossicità su RPMI8226.Luc

"% Specific Citotoxicity" = % di citotossicità specifica

FIGURE 2B, 8B

"Citotoxicity on U87MG.Luc" = Citotossicità su U87MG.Luc

TAVOLE 5, 6/10

FIGURE 3A, 3B, 4

"Citotoxicity on RPMI8226.Luc" = Citotossicità su RPMI8226.Luc

"% Specific Citotoxicity" = % di citotossicità specifica

TAVOLA 7/10

FIGURA 5

"packaging signal" = Segnale di impaccamento

"Cytoplasmic" = Citoplasmatico

TAVOLA 9/10

FIGURA 7

"Days" = Giorni

"Percent survival" = Percentuale di sopravvivenza

"T cell" = Cellula T

"CD19 CAR-T cell" = Cellula CAR-T CD19

"CD20 CAR-T cell" = Cellula CAR-T CD20

"CD19xCD20 CAR-T cell" = Cellula CAR-T CD19xCD20

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

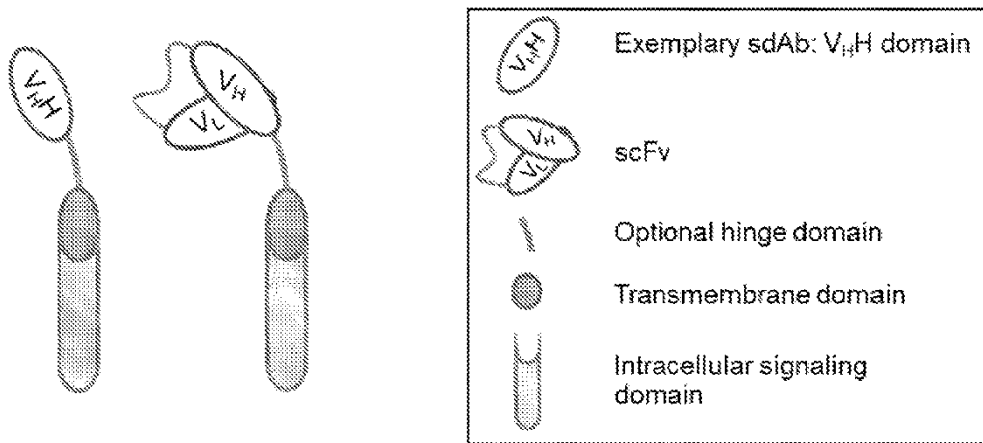


FIG. 1A

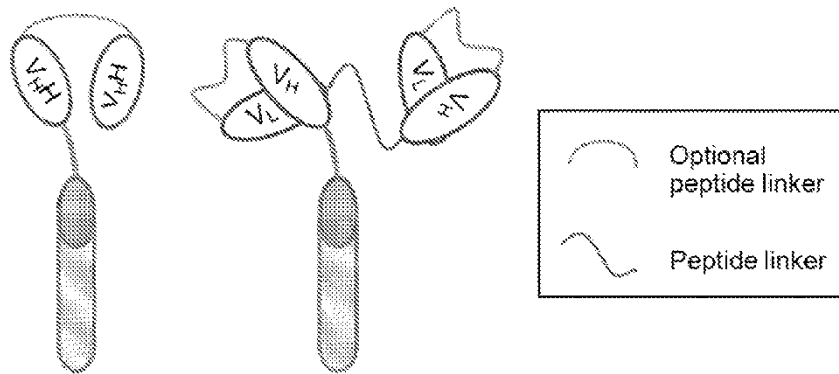


FIG. 1B

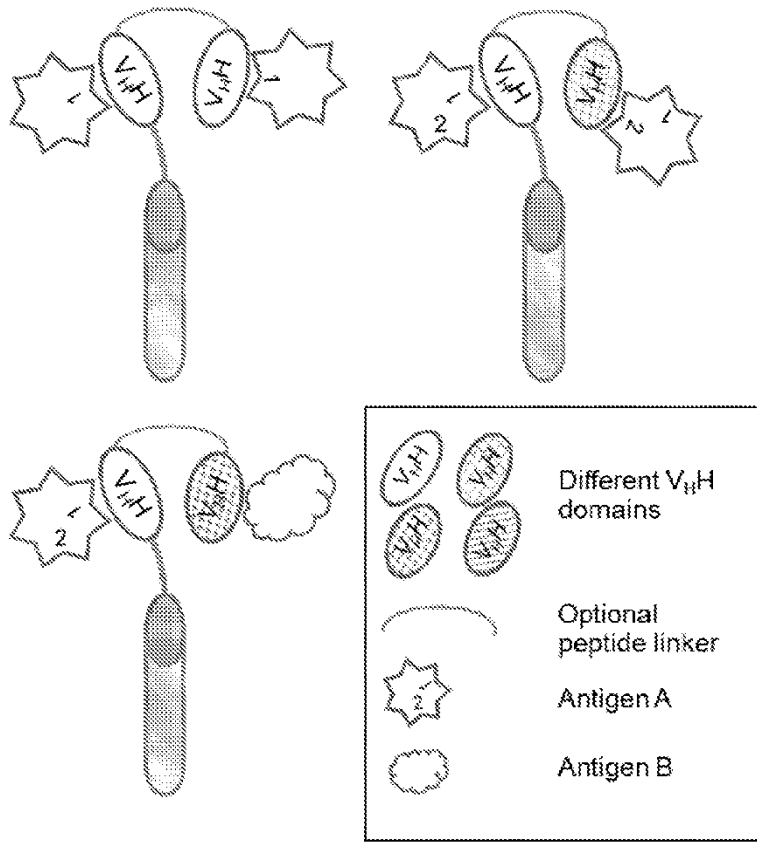


FIG. 1C

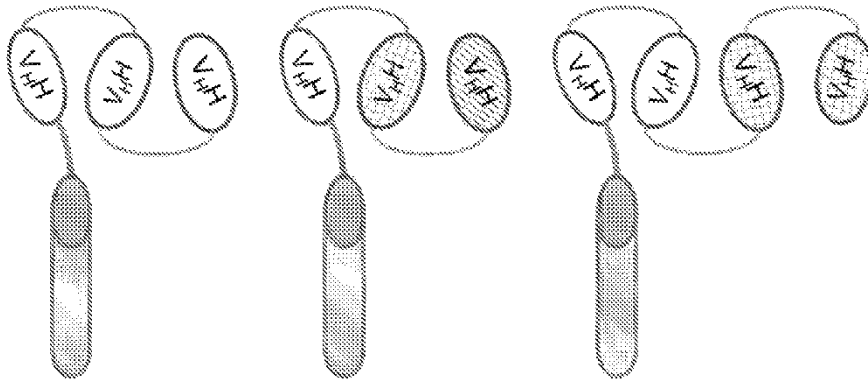


FIG. 1D

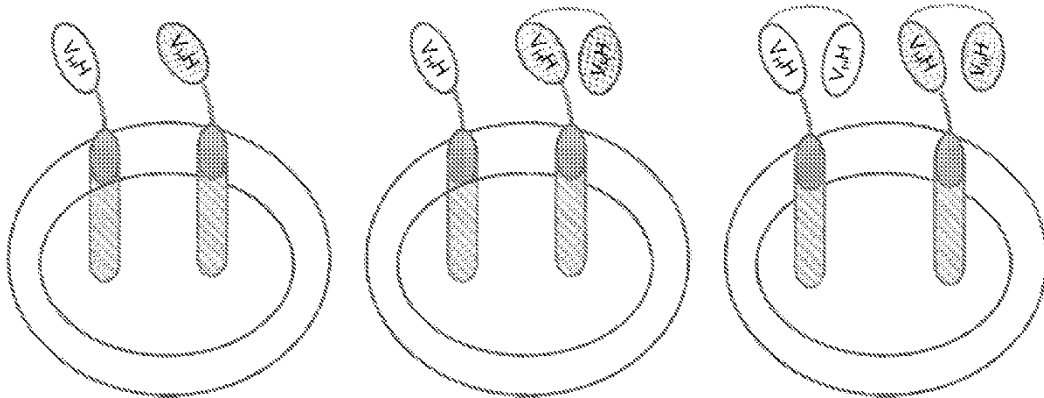


FIG. 1E

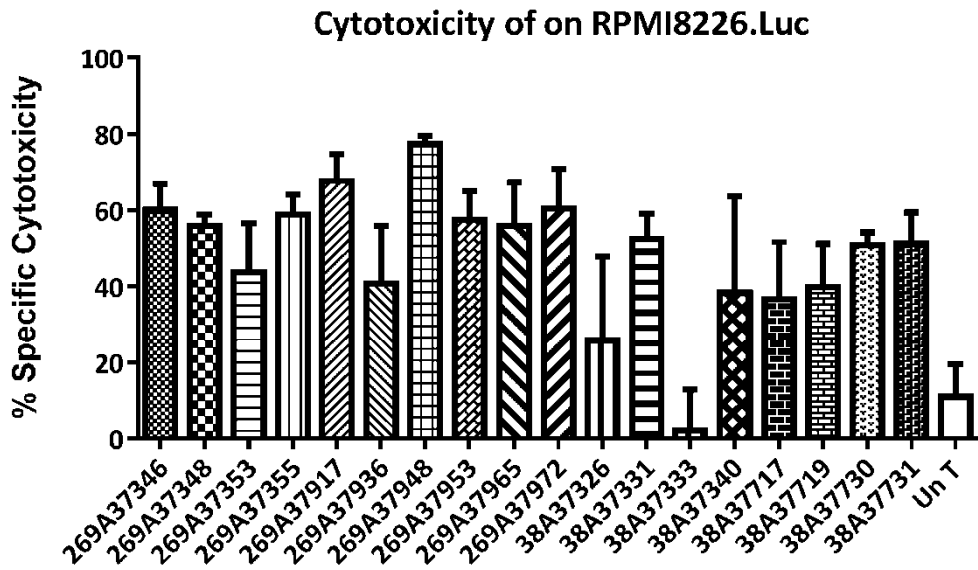


FIG. 2A

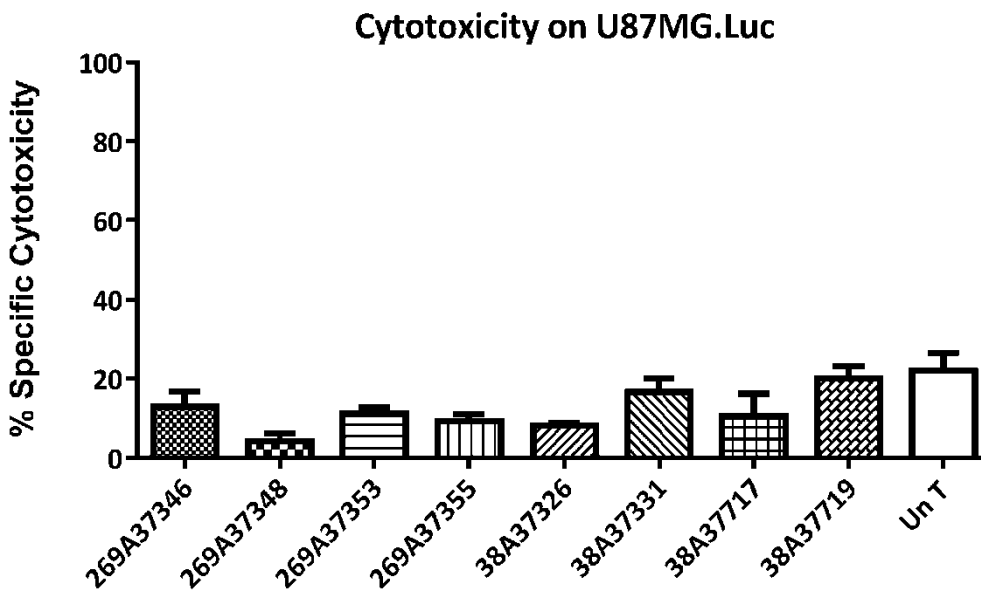


FIG. 2B

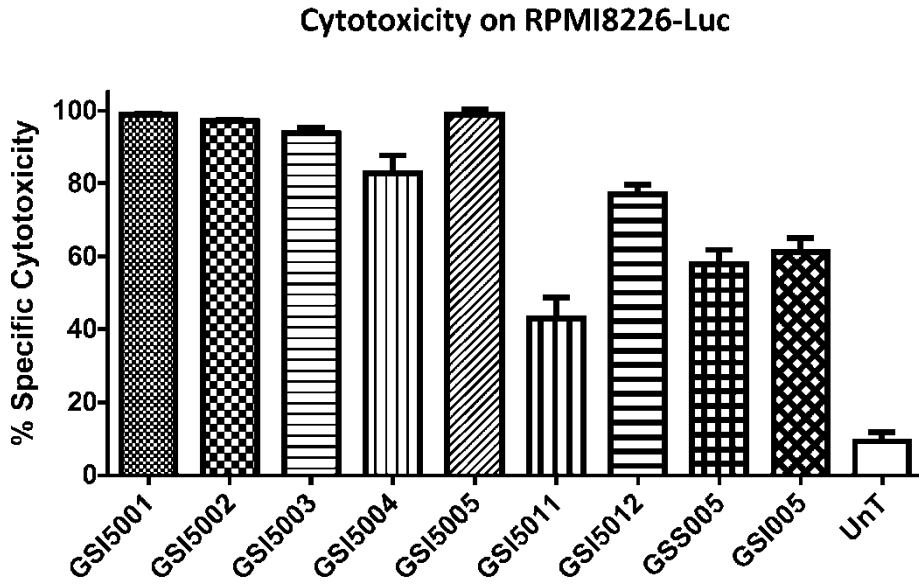


FIG. 3A

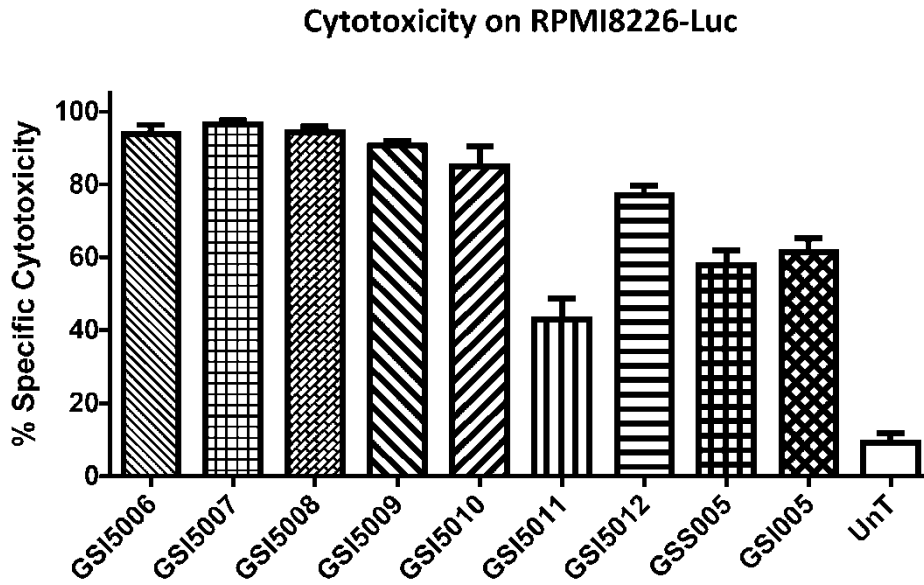


FIG. 3B

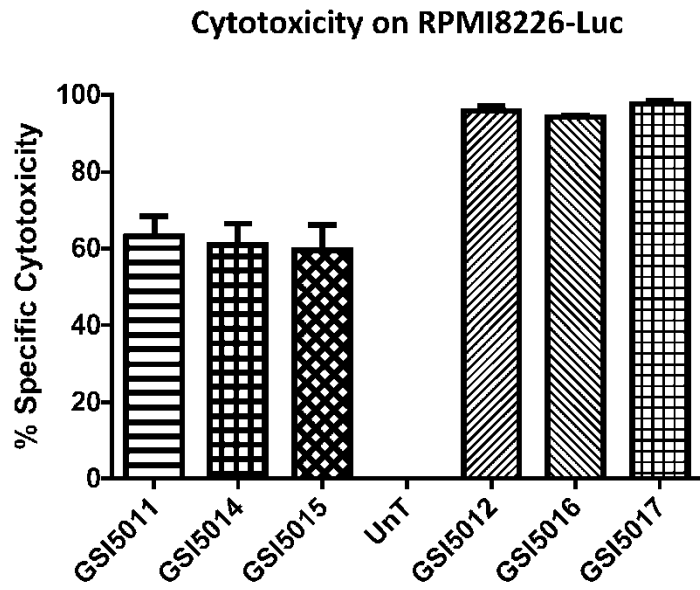


FIG. 4

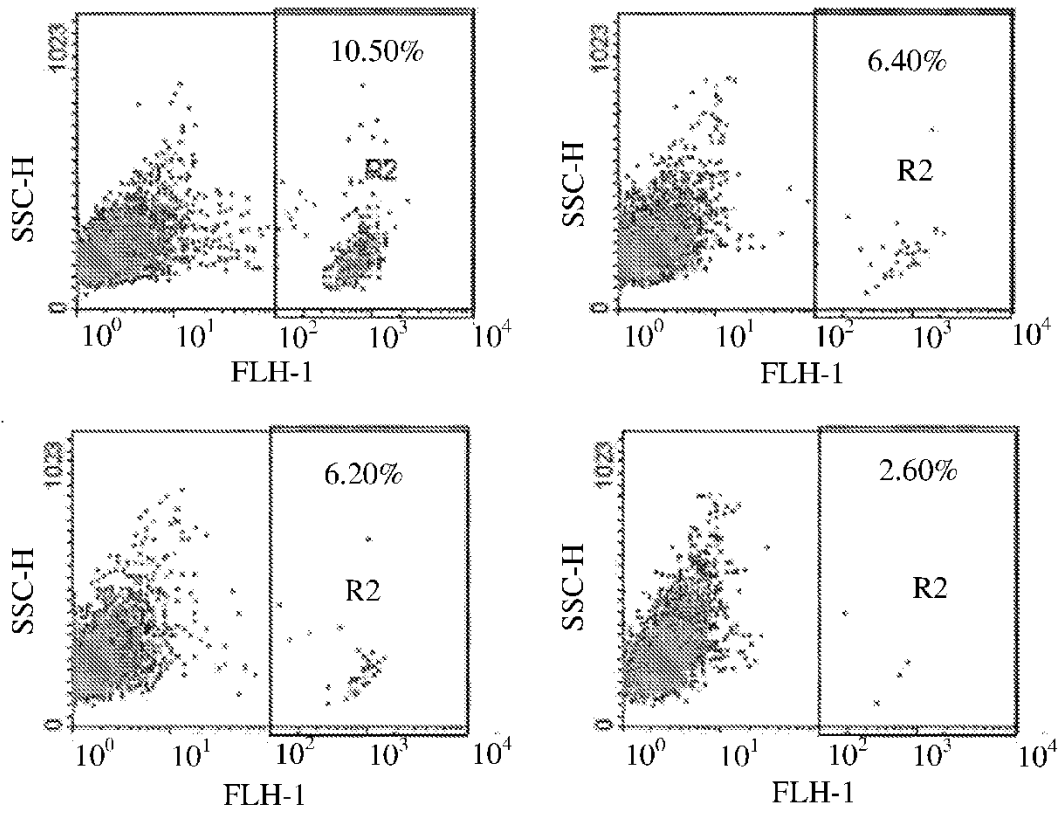


FIG. 6

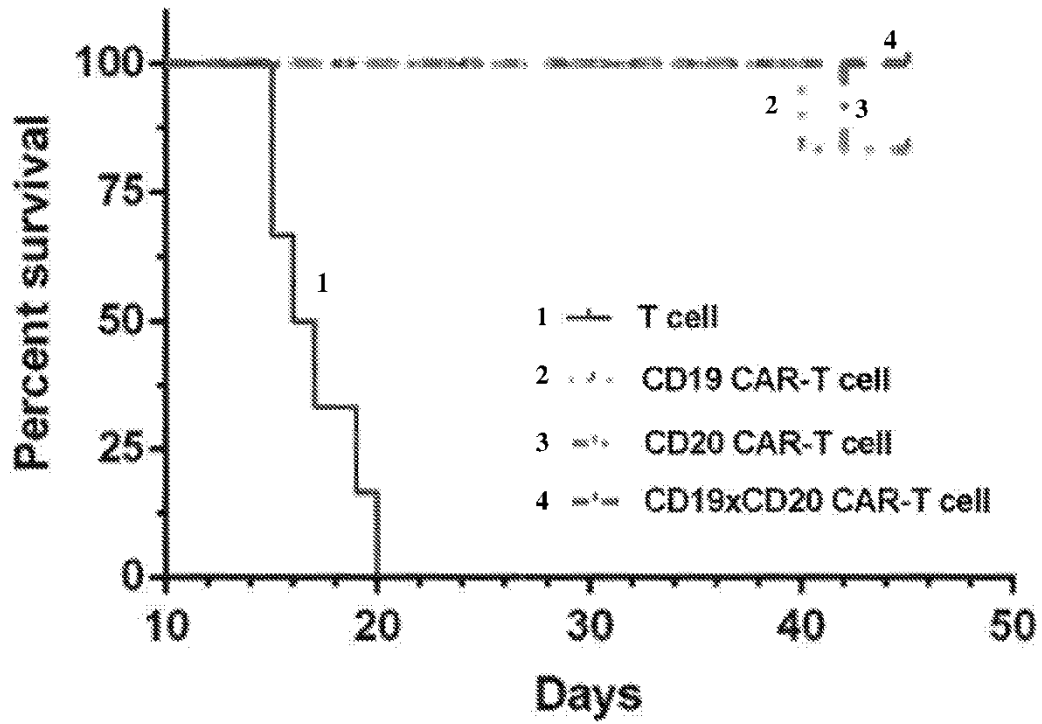


FIG. 7

Cytotoxicity on RPMI8226.Luc

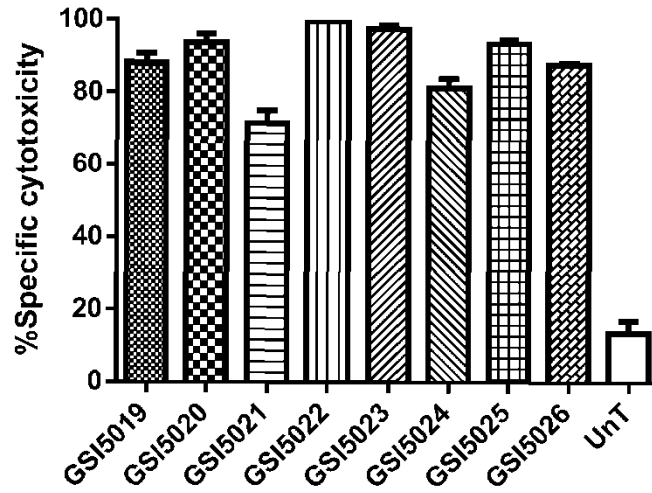


FIG. 8A

Cytotoxicity on U87MG.Luc

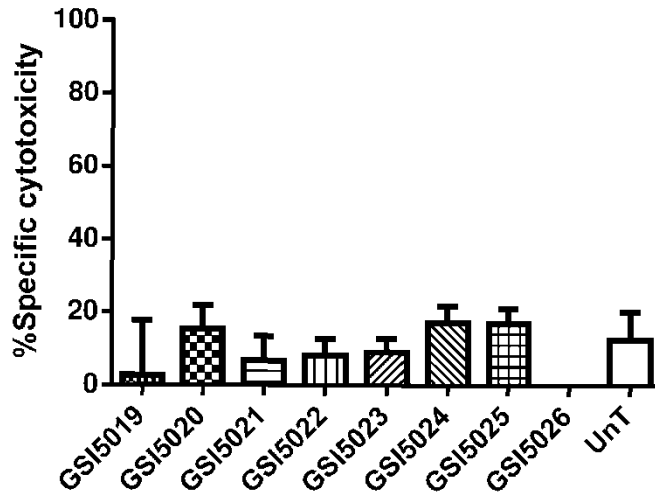


FIG.8B