

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046731**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.04.17**

(21) Номер заявки  
**202091918**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.02.11**

(51) Int. Cl. **C12Q 1/68 (2018.01)**  
**G01N 33/574 (2006.01)**  
**C07K 14/725 (2006.01)**

---

(54) **CAR-T КЛЕТКИ И АУТОИММУННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

---

(31) **62/629,103**

(32) **2018.02.11**

(33) **US**

(43) **2020.12.17**

(86) **PCT/US2019/017532**

(87) **WO 2019/157461 2019.08.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ  
(US)**

(72) Изобретатель:

**Блюстоун Джеффри А., Раффин  
Кэролайн (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A1-2017100428**  
**US-A1-20160333422**

---

(57) Трег, экспрессирующие химерный рецептор антигена (CAR), специфически нацелены на антиген, присутствующий в суставе пациентов с РА, для индукции локализованного и эффективного иммуносупрессивного ответа.

---

**B1**

**046731**

**046731**

**B1**

### Перекрестные ссылки на родственные заявки

Согласно 35 U.S.C. §119(e) настоящая заявка притязает на приоритет по предварительной заявке на патент США 62/629103, поданной 11 февраля 2018 г., включенной в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки.

### Область техники, к которой относится изобретение

Варианты осуществления изобретения относятся к химерным рецепторам антигена (CAR), Т-клеткам с химерным рецептором антигена (CAR-T) и применению для лечения заболеваний, таких как аутоиммунные заболевания.

### Уровень техники

Традиционно антиген-специфические Т-клетки получали путем селективного размножения Т-клеток периферической крови, изначально специфичных к целевому антигену. Однако сложно, а зачастую и невозможно осуществить выбор и получить большое количество Т-клеток, специфичных к большинству видов рака и аутоантигенов. Генная терапия с использованием интегрирующих векторов позволяет решить эту проблему, поскольку транскрипция экспрессии химерного рецептора антигена (CAR) позволяет получать большое количество Т-клеток, специфичных к любому поверхностному антигену, путем трансдукции вирусным вектором *ex vivo* основной популяции Т-клеток периферической крови.

### Сущность изобретения

Варианты осуществления изобретения, в частности, направлены на химерные рецепторы антигена (CAR), которые специфически распознают антигены, связанные с аутоиммунными заболеваниями. В частности, CAR являются специфичными к посттрансляционно модифицированным антигенам. CAR трансдуцируют в Т-клетки, такие как регуляторные Т-клетки, которые подавляют аутоиммунный ответ, или цитотоксические Т-клетки.

Соответственно в одном из аспектов настоящего изобретения предоставлен химерный рецептор антигена (CAR), содержащий антиген-специфический связывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен CD3 $\zeta$ , причем антиген-специфический связывающий домен специфически связывается с модифицированными полипептидами или их пептидами, включая цитруллинированные белки, такие как цитруллинированные белки внеклеточного матрикса и цитруллинированные белки клеточной поверхности.

Во втором аспекте настоящего изобретения предоставлен химерный рецептор антигена (CAR), содержащий антиген-специфический связывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен CD3 $\zeta$ , причем антиген-специфический связывающий домен специфически связывается с полипептидами или пептидами цитруллинированного виментина.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к выделенной Т-клетке, которая модифицирована для экспрессии: химерного рецептора антигена (CAR), содержащего антигенсвязывающий домен, связанный по меньшей мере с одним костимулирующим доменом и сигнальным доменом CD3 $\zeta$ , причем антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который специфически связывается с цитруллинированным виментином (CV). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит антитело, фрагмент антитела, нанотело, полученное от верблюда, или аптамер.

В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8; трансмембранный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или костимулирующий домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8; трансмембранный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или костимулирующий домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8; трансмембранный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или костимулирующий домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен кодируется последовательностью нук-



содержит трансмембранный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или костимулирующий домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8; CAR содержит трансмембранный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или костимулирующий домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 8; CAR содержит трансмембранный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9; сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 10; и/или костимулирующий домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8; CAR содержит трансмембранный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или костимулирующий домен 41BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8; CAR содержит трансмембранный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или костимулирующий домен 41BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8; CAR содержит трансмембранный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или костимулирующий домен 41BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 8; CAR содержит трансмембранный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9; сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 10; и/или костимулирующий домен 41BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой регуляторную Т-клетку млекопитающего (Treg). В некоторых вариантах осуществления Treg клетка представляет собой CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, FOXP3<sup>+</sup>.

В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии кодирует химерный рецептор антигена (CAR).

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей химерный рецептор антигена (CAR), вектор экспрессии, кодирующий химерный рецептор антигена (CAR), или выделенную Т-клетку, которая модифицирована для экспрессии химерного рецептора антигена (CAR).

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта с диагнозом ревматоидный артрит, включающему введение выделенной Т-клетки, которая модифицирована для экспрессии химерного рецептора антигена (CAR), причем CAR специфически связывается с антигеном, цитруллинированным виментином (CV). В некоторых аспектах субъекту также вводят противовоспалительные агенты и/или терапевтические агенты. В некоторых вариантах осуществления способ лечения субъекта, у которого диагностирован ревматоидный артрит, включает выделение Т-лимфоцитов из биологического образца, полученного от субъекта; отделение регуляторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток (Treg) от обычных Т-клеток (Tconv), причем Treg клетки являются CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, а Tconv клетки являются CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>;

трансдукцию Treg клеток вектором экспрессии, кодирующим химерный рецептор антигена (CAR), который специфически связывается с антигеном, цитруллинированным виментином (CV); размножение трансдуцированных Treg с помощью анти-CD3/CD28 гранул по меньшей мере один раз ex vivo для получения размноженных Treg клеток, специфичных к CV антигену; и повторную инфузию Treg субъекту, таким образом предоставляя лечение субъекту. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, связанный по меньшей мере с одним костимулирующим доменом и сигнальным доменом CD3 $\zeta$ , причем антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который специфически связывается с цитруллинированным виментином (CV). В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен содержит полипептид CD28 или 41BB. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8; CAR содержит трансмембранный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или костимулирующий домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8; CAR содержит трансмембранный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или костимулирующий домен 41BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к химерным рецепторам антигена (CAR), причем CAR трансдуцируют в различные типы клеток, включая Т-клетки, такие как регуляторные Т-клетки (Treg), цитотоксические Т-клетки (CTL), обычные Т-клетки (Tconv); другие типы клеток иммунной системы, такие как естественные киллерные клетки (NK); стволовые клетки, клеточные линии и т.п. CAR содержат антигенсвязывающие домены, созданные для специфических антигенов-мишеней заболевания, таких как внеклеточные антигены, антигены клеточной поверхности, вирусные антигены, посттрансляционно модифицированные антигены и т.п.

Другие аспекты описаны ниже.

### Определения

Если не определено иным образом, все термины (включая технические и научные термины), используемые в настоящем описании, имеют те же самые значения, как их обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Далее будет понятно, что термины, такие как термины, которые определены в обычно используемых словарях, следует интерпретировать как имеющие значение, соответствующее значению, используемому в контексте соответствующей области техники, и не должны быть интерпретированы в идеализированном или чрезмерно формальном смысле, если в настоящем описании в явном виде не указано иное.

Используемые в настоящем описании формы единственного числа включают формы множественного числа, если из контекста в явном виде не следует иное. Кроме того, в той степени, в которой термины "включая", "включает", "имеющий", "имеет", "с" или их варианты используются либо в подробном описании и/либо в формуле изобретения, такие термины используются аналогично термину "содержащий".

Термин "примерно" или "приблизительно" означает, что конкретное значение находится в допустимом диапазоне ошибок, определенном специалистом в данной области техники, что, в частности, будет зависеть от способа измерения или определения, т.е. ограничений системы измерения. Например, "примерно" может означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения на измерение в данной области техники. В качестве альтернативы "примерно" может означать диапазон до 20, до 10, до 5 или до 1% от заданного значения или диапазона. В качестве альтернативы, особенно в отношении биологических систем или процессов, этот термин может означать в пределах порядка величины, в пределах 5-кратного, а также в пределах 2-кратного значения. Если в заявке и формуле изобретения описаны конкретные значения, термин "примерно", если не указано иное, означает в пределах допустимого диапазона ошибок для конкретного значения.

В контексте настоящей заявки термин "сродство" означает меру силы связывания. Не ограничиваясь теорией, сродство зависит от близости стереохимического соответствия между связывающим участком антитела и антигенными детерминантами, размера области контакта между ними и распределения заряженных и гидрофобных групп. Сродство также включает термин "авидность", который относится к прочности связи антиген-антитело после образования обратимых комплексов. Способы вычисления сродства антитела к антигену известны в данной области, включая использование экспериментов по свя-

званию для вычисления сродства. Активность антител в функциональных анализах (например, в анализе проточной цитометрии) также отражает сродство антитела. Антитела и значения сродства можно фенотипически охарактеризовать и сравнить с помощью функциональных анализов (например, анализа проточной цитометрии).

В контексте настоящей заявки термин "агент" означает любую молекулу, химическое соединение, композицию, лекарственное вещество, терапевтический агент, химиотерапевтический агент или биологический агент, способные предотвратить развитие, облегчить или вылечить заболевание или другое медицинское состояние. Этот термин включает низкомолекулярные соединения, антисмысловые олигонуклеотиды, агенты миРНК (siRNA), антитела, фрагменты антител, несущие участки распознавания эпитопа, такие как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> фрагменты, Fv-фрагменты, одноцепочечные антитела, миметики антител (такие как DARPIn, молекулы аффител, аффилины, аффитины, антикалины, авимеры, финомеры, пептиды с доменом Куница и монотела), пептоиды, аптамеры; ферменты, пептиды, органические или неорганические молекулы, природные или синтетические соединения и т.п. Агент может быть исследован в соответствии со способами по изобретению на любой стадии во время клинических испытаний, во время предварительного тестирования или после одобрения FDA.

"Облегчение" означает уменьшение, подавление, ослабление, снижение, остановку или стабилизацию развития или прогрессирования заболевания.

В контексте настоящей заявки термин "антитело" означает не только интактные молекулы антител, но также фрагменты молекул антител, которые сохраняют иммуноген-связывающую способность. Такие фрагменты также хорошо известны в данной области и регулярно используются как *in vitro*, так и *in vivo*. Соответственно используемый в настоящем описании термин "антитело" означает не только интактные молекулы иммуноглобулина, но также хорошо известные активные фрагменты F(ab')<sub>2</sub> и Fab. F(ab')<sub>2</sub> и Fab фрагменты, в которых отсутствует Fc-фрагмент интактного антитела, быстрее выводятся из кровотока и могут иметь более низкое неспецифическое тканевое связывание интактного антитела (Wahl et al., J. Nucl. Med., 24:316-325 (1983)). Антитела по изобретению включают цельные нативные антитела, биспецифические антитела, химерные антитела, Fab, Fab', одноцепочечные фрагменты V-области (scFv), слитые полипептиды и нетрадиционные антитела.

Используемый в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения термин "или" обычно используется в значении, включающем "и/или", если из содержания в явном виде не следует иное.

Термин "химерный рецептор антигена" или "CAR" в контексте настоящего описания относится к антигенсвязывающему домену, который слит с внутриклеточным сигнальным доменом, способным активировать или стимулировать иммунную клетку, и в некоторых вариантах осуществления CAR также включает трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR состоит из одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), полученного в результате слияния варибельных областей тяжелой и легкой цепи мышинового или гуманизированного моноклонального антитела. Альтернативно можно использовать scFv, которые получены из Fab (а не из антитела, например, получены из библиотек Fab). В различных вариантах осуществления выполняют слияние scFv с трансмембранным доменом, а затем с внутриклеточным сигнальным доменом. CAR "первого поколения" включают CAR, которые обеспечивают только сигналы CD3 $\zeta$  при связывании антигена, CAR "второго поколения" включают CAR, которые обеспечивают как костимуляцию (например, CD28 или CD137), так и активацию (CD3 $\zeta$ ). CAR "третьего поколения" включают CAR, которые обеспечивают множественную костимуляцию (например, CD28 и CD137) и активацию (CD3 $\zeta$ ). Описано четвертое поколение CAR, CAR-T-клетки, перенаправленные на уничтожение цитокинов (TRUCKS), где вектор, содержащий конструкцию CAR, содержит кассету цитокинов. При лигировании CAR CAR-T-клетка обеспечивает отложение провоспалительного цитокина в местах поражения опухолью. CAR-T-клетка представляет собой T-клетку, которая экспрессирует химерный рецептор антигена. Фраза "химерный рецептор антигена (CAR)" в том смысле, как используется в настоящем описании и обычно используется в данной области, относится к рекомбинантному слитому белку, который имеет антиген-специфический внеклеточный домен, связанный с внутриклеточным доменом, который направляет клетку на выполнение специализированной функции при связывании антигена с внеклеточным доменом. Термины "искусственный T-клеточный рецептор", "химерный T-клеточный рецептор" и "химерный иммунорецептор" могут использоваться в настоящем описании взаимозаменяемо с термином "химерный рецептор антигена".

Используемые в настоящем описании термины "содержащий", "содержит" или "содержащийся" и их варианты в отношении определенных или описанных элементов объекта, композиции, устройства, способа, процесса, системы и т.д. относятся к закрытому или открытому списку, разрешающему дополнительные элементы, тем самым указывая, что определенный или описанный элемент, состав, устройство, способ, процесс, система и т.д. включает эти указанные элементы или, в соответствующих случаях, их эквиваленты, и что в объем/определение определенного элемента, состава, устройства, способа, процесса, системы и т.д. могут быть включены и по-прежнему подпадают другие элементы.

"Диагностический" или "диагностированный" означает определение наличия или характера патологического состояния. Диагностические методы различаются по чувствительности и специфичности.

"Чувствительность" диагностического анализа представляет собой процент имеющих заболевание индивидуумов с положительным результатом анализа (процент "истинно положительных"). Имеющие заболевание индивидуумы, не обнаруженные с помощью анализа, являются "ложноотрицательными". Субъекты, которые не болеют и у которых результаты теста отрицательные, называются "истинно отрицательными". "Специфичность" диагностического анализа составляет 1 минус показатель ложноположительных результатов, причем показатель "ложноположительных результатов" определяют как долю индивидуумов, не имеющих заболевания, но результаты анализа которых оказались положительными. Хотя конкретный диагностический метод может не обеспечивать окончательного диагноза состояния, он является достаточным, если этот метод обеспечивает положительный показатель, который способствует установлению диагноза.

"Заболевание" представляет собой состояние здоровья животного, при котором животное не может поддерживать гомеостаз, и при котором, если заболевание не купируется, здоровье животного продолжает ухудшаться. Примеры заболеваний включают аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит (РА), воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона (CD), анкилозирующий спондилит (AS) и т.п.

Термин "шарнир" или "шарнирная область" относится к гибкой соединительной области, например природным или синтетическим полипептидам или молекулам любого другого типа, обеспечивающей структурную гибкость и расположение фланкирующих областей полипептида на некотором расстоянии друг от друга.

Термин "лентивирус" в контексте настоящего описания относится к роду семейства Retroviridae. Лентивирусы уникальны среди ретровирусов тем, что они способны инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительный объем генетической информации в ДНК клетки-хозяина, поэтому являются одним из наиболее эффективных методов векторной доставки генов. ВИЧ (HIV), SIV и FIV являются примерами лентивирусов.

Термин "линкер", также называемый "спейсер" или "спейсерный домен", в контексте настоящего описания относится к аминокислоте или последовательности аминокислот, которая необязательно расположена между двумя аминокислотными последовательностями в слитом белке по изобретению.

"Парентеральное" введение иммуногенной композиции включает, например, подкожные (s.c), внутривенные (i.v.), внутримышечные (i.m.) или внутригрудные инъекции или инфузии.

Термины "пациент", "индивидуум" или "субъект" используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к млекопитающему, подлежащему лечению, причем предпочтение отдается пациентам-людям. В некоторых случаях способы по изобретению находят применение в отношении экспериментальных животных, в ветеринарии и при разработке животных моделей болезней, включая без ограничения грызунов, включая мышей, крыс и хомяков и приматов.

Используемый в настоящем описании термин "однопочечный вариабельный фрагмент" или "scFv" представляет собой слитый белок вариабельных областей тяжелой (VH) и легкой цепей (VL) иммуноглобулина. Тяжелая (VH) и легкая цепи (VL) либо соединены напрямую, либо соединены посредством линкера, кодирующего пептид (например, 10, 15, 20, 25 аминокислот), который соединяет N-конец VH с C-концом VL или C-конец VH с N-концом VL. Линкер обычно богат глицином, обеспечивающим гибкость, а также серином или треонином, обеспечивающими растворимость. Несмотря на удаление константных областей и введение линкера, белки scFv сохраняют специфичность исходного иммуноглобулина. Однопочечные Fv-полипептидные антитела можно экспрессировать из нуклеиновой кислоты, включая последовательности, кодирующие VH и VL, как описано Huston et al. (Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 85:5879-5883, 1988). См. также патенты США № 5091513, 5132405 и 4956778; и публикации патентов США № 20050196754 и 20050196754. Описаны антагонистические scFv, обладающие ингибирующей активностью (см., например, Zhao et al., Hybridoma (Larchmt), 2008, 27(6):455-51; Peter et al., J. Cachexia Sarcopenia Muscle, 2012 August 12; Shieh et al., J Immunol., 2009, 183(4):2277-85; Giomarelli et al., Thromb Haemost, 2007, 97(6):955-63; Fife et al., J. Clin. Invest., 2006, 116(8):2252-61; Brocks et al., Immunotechnology, 1997, 3(3):173-84; Moosmayer et al., Ther. Immunol., 1995, 2(10):31-40). Описаны агонистические scFv, обладающие стимулирующей активностью (см., например, Peter et al., J. Biol. Chem., 2003, 278(38):36740-7; Xie et al., Nat. Biotech., 1997, 15(8):768-71; Ledbetter et al., Crit. Rev. Immunol., 1997, 17(5-6):427-55; Ho et al., Biochim. Biophys. Acta, 2003, 1638(3):257-66).

Используемые в настоящем описании термины "лечить", "лечение" и т.п. относятся к ослаблению или облегчению расстройства и/или симптомов, связанных с ним. Следует понимать, что, хотя это и не исключено, лечение расстройства или состояния не требует полного устранения расстройства, состояния или симптомов, связанных с ним.

"Вектор" представляет собой композицию вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которую можно использовать для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Примеры векторов включают без ограничения линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин "вектор" включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Термин также включает неплазмидные и невирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, напри-

мер, соединения полилизина, липосомы и т.п. Примеры вирусных векторов включают без ограничения аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы и т.п.

Все гены, названия генов и генные продукты, раскрытые в настоящем описании, соответствуют гомологам любых видов, для которых применимы раскрытые в настоящем описании композиции и способы. Таким образом, термины включают без ограничения гены и генные продукты человека и мышей. Понятно, что при раскрытии гена или генного продукта, полученного от конкретного вида, такое раскрытие предоставлено только в качестве примера и не должно быть интерпретировано как ограничение, если только из контекста, в котором оно встречается, в явном виде не следует иное. Таким образом, например, для генов или генных продуктов, раскрытых в настоящем описании, которые в некоторых вариантах осуществления относятся к последовательностям нуклеиновых кислот и аминокислотным последовательностям млекопитающих, охватывают гомологичные и/или ортологичные гены и генные продукты других животных, включая, без ограничения: других млекопитающих, рыб, земноводных, рептилий и птиц. В предпочтительных вариантах осуществления гены, последовательности нуклеиновых кислот, аминокислотные последовательности, пептиды, полипептиды и белки являются человеческими. Термин "ген" также включает варианты.

Подразумевается, что диапазоны, представленные в настоящем описании, являются сокращением всех значений, находящихся в пределах этого диапазона. Например, подразумевается, что диапазон от 1 до 50 включает любое число, комбинацию чисел или поддиапазон из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.

Для реализации настоящего изобретения используются, если не указано иное, традиционные методы, применяемые в области химии, молекулярной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК, генетики, иммунологии, клеточной биологии, культуры клеток и трансгенной биологии, которые находятся в пределах компетентности специалиста в данной области. См., например, Maniatis et al., 1982, *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook and Russell, 2001, *Molecular Cloning*, 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Ausubel et al., 1992), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, including periodic updates); Glover, 1985, *DNA Cloning* (IRL Press, Oxford); Anand, 1992; Guthrie and Fink, 1991; Harlow and Lane, 1988, *Antibodies* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Jakoby and Pastan, 1979; *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); *Culture of Animal Cells* (R.I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); монография, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.H. Miller and M.P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods in Enzymology*, vols. 154, 155 (Wu et al., eds.), *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D.M. Weir, C.C. Blackwell, eds., 1986); Riott, *Essential Immunology*, 6th edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986); Westerfield, M., *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)* (4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene, 2000).

#### Краткое описание рисунков

Фиг. 1 представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую процессы, реализованные в соответствии с некоторыми вариантами осуществления.

Фиг. 2 представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую процессы, реализованные в соответствии с некоторыми вариантами осуществления для создания (CV)-CAR-Treg.

Фиг. 3 представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую CV-CAR-Treg клетки, нацеленные на антигены у пациента.

На фиг. 4 показана оценка специфичности и сродства к CV одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), синтезированного из антитела BVCA1. Оценивали образцы человека и мыши. Использовали твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Результаты показывают, что, как и антитело BVCA1 (описанное на фиг. 7), scFv BVCA1 является специфичным к цитруллинированному виментину.

На фиг. 5A и 5B показана оценка специфичности и сродства к CV одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), синтезированного из антитела BVCA1. Константу диссоциации ( $K_D$ ) измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (система Biacore). Результаты показывают, что (фиг. 5A)  $K_D$  между полностью человеческим IgG BVCA1 и человеческим пептидом CV составляет 10 нМ и что (фиг. 5B)  $K_D$  между scFv BVCA1 и человеческим пептидом CV составляет 198 нМ. Эти результаты свидетельствуют о том, что, как и антитело BVCA1, scFv BVCA1 является специфичным к цитруллинированному виментину.

На фиг. 6 показано сравнение последовательностей человеческого и мышиногo виментин<sub>60-75</sub> пептида, показывающее, что последовательности очень похожи и что три аминокислоты аргинина (сокращенно R), которые превращены в цитруллин после цитруллинирования, у обоих видов находятся в иден-



тичных местоположениях.

На фиг. 7 показана оценка специфичности и сродства к CV с использованием антитела BVCA1. Использовали твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Результаты показывают, что как человеческие, так и мышьи антитела BVCA1 являются специфичными к цитруллинированному виментину как человека, так и мыши.

На фиг. 8А показано схематическое изображение CV-CAR, демонстрирующее домены CV-CAR. На фиг. 8В показано схематическое изображение одного примера определенных доменов CV-CAR, созданного в соответствии с некоторыми вариантами осуществления. CV-CAR включает scFv  $\alpha$ CV, шарнирную область и трансмембранный мотив (ТМ), костимулирующий домен (либо CD28 (CV.28z-CAR), либо 41BB (CV.41BBz-CAR)), CD3 $\zeta$ . Используется нативная ТМ-часть CD28; укороченная версия рецептора эпидермального фактора роста (EGFRt), предназначенная для использования в качестве репортера, находится на С-конце и отделена от последовательности CAR пептидом T2A, обеспечивающим отщепление репортера EGFRt.

На фиг. 9 показан пример временной шкалы создания, размножения и оценки CV-специфического CAR, введенного в Treg, *in vitro*.

На фиг. 10А и 10В показан анализ петель разной длины конструкций CAR. В день 5 после трансдукции CV-CAR<sup>+</sup> Treg сортировали на основе экспрессии EGFRt с помощью проточной цитометрии. Затем отсортированные CV-CAR-Treg клетки повторно стимулировали в присутствии или в отсутствие анти-CD3/CD28 гранул или CV-пептид/стрептавидин (CV-пер-SA) гранул. На фиг. 10А показан анализ экспрессии маркеров активации CD71 и CD25 в день 3 после повторной стимуляции. На фиг. 10В показан анализ роста клеток в день 5 после повторной стимуляции.

На фиг. 11А-11D показан сравнительный анализ конструкций CV-CAR с различными версиями scFv BVCA1. Клетки Tconv и Treg трансдуцировали различными версиями конструкции CV-CAR в день 2 после стимуляции. Эффективность трансдукции оценивали методом проточной цитометрии. Показан процент содержания клеток, экспрессирующих CAR-репортерный ген (фиг. 11А) и CV-CAR (фиг. 11В) на поверхности клетки. Через два дня после второго раунда стимуляции в различных стимулирующих условиях (только IL-2, анти-CD3/CD28 гранулы и CV-SA гранулы) анализировали экспрессию маркеров активации CD69 и CD71 с помощью проточной цитометрии (фиг. 11С и 11D).

На фиг. 12А-12С показана оценка поверхностной экспрессии репортера EGFRt в Treg и Tconv. На фиг. 12А показана оценка поверхностной экспрессии репортера EGFRt в Treg и Tconv с помощью проточной цитометрии в день 4 после трансдукции различными конструкциями CAR. Сводка данных по всем донорам (n=4). На фиг. 12В показаны репрезентативные точечные графики поверхностной экспрессии репортера EGFRt в Treg и Tconv с помощью проточной цитометрии в день 4 после трансдукции различными конструкциями CAR. На фиг. 12С показано схематическое изображение комплекса биотинилированный пептид CV (пер)/SA-FITC. На фиг. 12D показана оценка поверхностной экспрессии репортера EGFRt и CV-CAR в Treg. Treg клетки окрашивали для выявления CV-CAR с помощью тетрамера биотинилированный CV-пептид/стрептавидин, конъюгированный с FITC (CVпер-SA-FITC) и антитела к EGFRt в день 5 после трансдукции. Точечные диаграммы представляют 4 независимых эксперимента.

Фиг. 13 представляет собой схематическое изображение биотинилированный CV-пер-SA гранулы, образованной из SA DYNABEAD®, покрытой биотинилированным пептидом CV.

На фиг. 14А-14С показана оценка способности сигнала, опосредованного CV-CAR, активировать созданные CV-CAR-Treg. После обогащения CV-специфических CAR<sup>+</sup> Treg с помощью проточной цитометрии клетки повторно стимулировали в присутствии или в отсутствие анти-CD3/CD28 гранул или гранул с биотинилированным CV (CV-пер-SA). На фиг. 14А показана оценка кластеризации клеток в день 1. На фиг. 14В показана оценка экспрессии маркеров активации CD71 и CD25 в день 3. На фиг. 14С показана оценка кратности роста различных популяций CAR-Treg во всех условиях, измеренная в день 5 после повторной стимуляции.

На фиг. 15А-15С показана оценка фенотипа и стабильности CV-CAR-Treg после размножения *in vitro*. Нетрансдуцированные Treg и CV-CAR-Treg подвергали двум циклам стимуляции со вторым циклом активации либо анти-CD3/CD28 гранулами, либо CV-SA гранулами. На фиг. 15А показана оценка клеток на способность к поверхностной экспрессии CD25 и CD127 в день 18 с помощью проточной цитометрии. На фиг. 15В показана оценка клеток на способность к внутриядерной экспрессии FOXP3 и Helios в день 18 с помощью проточной цитометрии. На фиг. 15С показана оценка профиля продуцирования цитокинов размноженными Treg после стимуляции клеток PMA/иономицином в течение 4 ч, последние 2 ч в присутствии брэфельдина А. Затем клетки фиксировали и окрашивали антителами, нацеленными на IFN-g, IL-2, IL-10 и IL-17.

На фиг. 16А и 16В показана оценка способности CV-CAR-T-лимфоцитов активироваться в присутствии синовиальной жидкости, взятой из сустава пациентов с ревматоидным артритом (РА). Размноженные Treg, экспрессирующие различные конструкции CAR, а также нетрансдуцированные Treg, помещали в культуру в присутствии IL-2 с CV-SA гранулами или без них или синовиальную жидкость, полученную от пациента с РА. Экспрессию CD71 оценивали с помощью проточной цитометрии через 3,5 дня культиви-

вирования. На фиг. 16А показана оценка экспрессии CD71 и EGFRt (точечные графики). Числа красного цвета (в верхнем правом углу каждого графика) представляют процент клеток CD71<sup>+</sup> среди фракции EGFRt<sup>+</sup>. На фиг. 16В показан процент клеток CD71<sup>+</sup> среди фракций EGFRt<sup>-</sup> и EGFRt<sup>+</sup> в различных популяциях CAR-Treg.

На фиг. 17А и 17В показана оценка способности CV-специфического CAR экспрессироваться на поверхности Treg после трансдукции лентивирусом. Детектирование как CAR (с использованием антитела к человеческому IgG (H+L)), так и рецептора эпидермального фактора роста (EGFRt) осуществляли с помощью проточной цитометрии. На фиг. 17А показана оценка экспрессии CAR и EGFRt на поверхности нетрансдуцированных Treg, CV/CD28ζ CAR<sup>+</sup> Treg и CV/41BBζ CAR<sup>+</sup> Treg. На фиг. 17В показан процент CAR<sup>+</sup> клеток в различных экспериментах.

На фиг. 18А-18С показана оценка способности CV-CAR-T-лимфоцитов активироваться в присутствии синовиальной жидкости, взятой из сустава пациентов с ревматоидным артритом (РА). Размноженные Treg, экспрессирующие различные конструкции CAR (19.28ζ-CAR-Treg, 19.41BBζ-CAR-Treg, CV.28ζ-CAR-Treg и 19.41BBζ-CAR-Treg), а также нетрансдуцированные (UTD) Treg, помещали в культуру в присутствии IL-2 с CV-SA гранулами или без них или синовиальную жидкость (СЖ, SF), полученную от 3 разных пациентов с РА или без РА, или СЖ, полученную от контрольного пациента с подагрой. Экспрессию маркера активации CD71 оценивали с помощью проточной цитометрии через 3,5 дня культивирования. На фиг. 18А показана экспрессия CD71 и EGFRt в популяции CV.28ζ-CAR-Treg после совместного культивирования в различных условиях. На фиг. 18В показаны репрезентативные точечные графики, показывающие экспрессию CD71 к EGFRt в 19,28ζ-CAR-Treg и CV.28ζ-CAR-Treg в присутствии СЖ, полученной от пациента отрицательного контроля с подагры, или РА СЖ. На фиг. 18С показана сводная информация о процентном содержании клеток CD71<sup>+</sup> среди фракций EGFRt<sup>-</sup> и EGFRt<sup>+</sup> в различных популяциях CAR-Treg после совместного культивирования в присутствии СЖ, полученной от пациентов с РА, n=4).

На фиг. 19 показана оценка экспрессии EGFRt в клетках НЕК 293Т с помощью проточной цитометрии через три дня после трансфекции. Конструкция CV-CAR эффективно экспрессируется на клеточной поверхности клеток НЕК 293Т после трансфекции.

На фиг. 20А и 20В показана оценка экспрессии цитруллинированного виментина в линии опухолевых клеток SKNBE2с после трансдукции лентивирусной плазмидой PAD2-GFP. Ген человеческого фермента пептидиларгининдеаминазы (PAD2) вставляли в лентивирусный вектор с репортером GFP, а затем трансдуцировали в клетки SKNBE2с, линию опухолевых клеток, которые, как известно, экспрессируют белок виментина на своей поверхности. Согласно фиг. 20А через три дня после трансдукции оценивали экспрессию GFP в клетках SKNBE2с с помощью проточной цитометрии. Согласно фиг. 20В присутствие цитруллинированного виментина в клетках SKNBE2с дикого типа (WT) и PAD2-GFP оценивали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания.

На фиг. 21 показано обнаружение цитруллинированного виментина в синовиальных жидкостях прямым ELISA. Присутствие цитруллинированного виментина оценивали с помощью ELISA в синовиальных жидкостях пациентов с РА и отрицательного контроля с подагрой. Цитруллинированные и нецитруллинированные белки виментина использовали в качестве положительного и отрицательного контролей соответственно.

На фиг. 22А и 22В показана оценка CAR-опосредованной стимуляции CV-специфических CAR-Treg в присутствии бесклеточной синовиальной жидкости, полученной от пациентов с РА. На фиг. 22А показаны репрезентативные точечные графики, отображающие экспрессию CD71 к EGFRt через 3 дня культивирования в присутствии цельной синовиальной жидкости или бесклеточного супернатанта синовиальной жидкости, полученной от пациента с РА. На фиг. 22В показан процент CD71<sup>+</sup> клеток среди фракций EGFRt<sup>-</sup> и EGFRt<sup>+</sup> в CV.28z-CAR-Treg после совместного культивирования с цельной или бесклеточной синовиальной жидкостью, полученной от пациентов с РА.

На фиг. 23А и 23В показано создание TCR<sup>KO</sup> CV.28z-CAR<sup>+</sup> Treg клеток. На фиг. 23А показано схематическое изображение протокола получения TCR<sup>KO</sup> CV.28z-CAR<sup>+</sup> Treg. На фиг. 23В показана чистота CV.28z-CAR<sup>+</sup> Treg клеток после обогащения с помощью проточной цитометрии в день 9. На верхнем точечном графике показаны клетки, которые не подверглись CRISPR/Cas9 TCR нокауту в день 0, тогда как клетки на нижнем точечном графике подверглись.

На фиг. 24А и 24В показана оценка супрессорной функции CV-CAR-Treg после CAR-опосредованной стимуляции. Согласно фиг. 24А TCR<sup>KO</sup> CV.28z-CAR<sup>+</sup> Treg совместно культивировали с CD4<sup>+</sup> Т-клетками-респондерами при указанном соотношении респондер/супрессорная клетка в присутствии связанных с планшетом анти-CD3 антител и CV-рер-SA (CVb) гранул. В день 3 добавляли 3Н-тимидин. Результаты представлены в виде процента подавления, вычисленного на основе среднего числа импульсов в минуту (СРМ), измеренного путем включения 3Н тимидина, полученного при совместном культивировании респондеров и Treg клеток, и полученного в присутствии только респондеров (эксперимент проводили в двух повторах). Согласно фиг. 24В TCR<sup>KO</sup> CV.28z-CAR<sup>+</sup> Treg были CD4<sup>+</sup> Т-клетками-респондерами при соотношении 2:1 (респондер:Treg) в присутствии связанных с планшетом анти-CD3 антител и гранул с CVb

или виментином. 19,28z-CAR<sup>+</sup> Treg совместно культивировали с CFSE-мечеными CD4<sup>+</sup> Т-клетками-респондерами в соотношении 2:1 (респондер:Treg) в присутствии связанных с планшетом анти-CD3 антител и CVb. Данные анализировали, как на фиг. 24А.

### Подробное описание изобретения

Имеется неудовлетворенная потребность в лечении аутоиммунных заболеваний. Например, до сих пор не найден способ лечения, позволяющий излечить ревматоидный артрит. Пациенты с РА вынуждены получать пожизненное лечение со всеми сопутствующими расходами, потенциальными побочными эффектами и неудобствами. Эту первую неудовлетворенную потребность позволяют решить изобретения, варианты осуществления которых приведены в настоящем описании, предназначенные для лечения пациентов с РА путем восстановления соответствующей иммунной толерантности. Говоря в общем, несмотря на интенсивное изучение использования CAR-T-клеток при раке и получения весьма многообещающих результатов в клинических испытаниях, еще не проводилось тестирование использования CAR-T-клеток при аутоиммунных нарушениях или других болезненных состояниях, таких как опухоли или хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), при которых задействован цитруллинированный виментин (CV). Таким образом, вторая неудовлетворенная потребность, решаемая изобретением, варианты осуществления которого раскрыты в настоящем описании, заключается в применении CAR-T-клеточной терапии для лечения аутоиммунных заболеваний с использованием Treg вместо эффекторных Т-клеток.

Соответственно, как подробно описано в приведенном ниже разделе "Примеры", для специфического нацеливания на посттрансляционно модифицированный белок, называемый цитруллинированный виментин (CV), который экспрессируется во внеклеточном матриксе воспаленных суставов у пациентов с ревматоидным артритом (РА) и на некоторых опухолевых клетках, методом генной инженерии создавали (конструировали) химерный рецептор антигена (CAR). Варибельную часть одноцепочечного фрагмента (scFv) CV-CAR получали из антитела, высокоспецифичного к белку CV, выделенному из периферической крови пациента с РА. CV-специфическую цепь scFv вставляли в конструкцию CAR второго поколения, клонированную в лентивирусном векторе. Эту конструкцию CAR вводили как в эффекторные Т-клетки, так и в регуляторные Т-клетки. CV-CAR-Treg были способны специфически распознавать свой целевой антиген в присутствии тетрамеров пептида CV и при совместном культивировании с синовиальной жидкостью пациентов с РА. После распознавания антигена CV-CAR-Treg клетки активировались и размножались, сохраняя при этом фенотип Treg.

Химерные рецепторы антигена и Т-клетки.

Химерные рецепторы антигена (CAR) представляют собой сконструированные трансмембранные химерные белки, предназначенные для придания Т-клеткам антигенной специфичности. Они представляют собой рекомбинантные рецепторы, содержащие антигенсвязывающую область, трансмембранную область и внутриклеточную сигнальную область.

В общем случае CV-CAR-Treg создавали для применения при разработке клеточной терапии для пациента с РА (см., например, фиг. 2). Терапевтический подход заключается в применении Treg пациента (аутологичных) путем выделения клеток из образца крови. Затем выделенные Treg генетически модифицируют с использованием лентивирусного вектора, несущего трансген CV-CAR. CV-CAR-Treg подвергают двум раундам размножения *in vitro*, а затем их вводят пациенту путем инфузии в комбинации с анти-TNF терапией или без нее для оптимизации эффективности Treg на участках заболевания (см., например, фиг. 1).

Антиген, на который нацелен CV-CAR, представляет собой посттрансляционно модифицированный антиген, который связывается с цитруллинированной версией белка, но не его нативной формой. CV-CAR является первым CAR, разработанным для нацеливания на цитруллинированный антиген. Результаты, описанные в разделе "Примеры", показывают, что CAR, нацеленный на посттрансляционно модифицированный антиген, может успешно распознавать свою мишень и активировать клетки, свидетельствуя о том, что посттрансляционно модифицированные антигены представляют собой очень интересные терапевтические инструменты для разработки новых терапевтических стратегий при аутоиммунных нарушениях и даже при некоторых видах рака. Более того, такой CAR нацелен на белок внеклеточного матрикса, секретлируемый некоторыми клетками, в мультимерном комплексе, который может представлять собой новое применение CAR. Цитруллинированный виментин (CV) присутствует во внеклеточном матриксе воспаленных суставов у пациентов с ревматоидным артритом (РА) и экспрессируется на некоторых опухолевых клетках. Виментин представляет собой белок промежуточных филаментов типа III, и его цитруллинированная форма находится в избыточном количестве в микроокружении суставов. Экспрессия CV ограничена селезенкой и плацентой здорового человека. У 50% пациентов с РА в синовиальной ткани присутствуют очень высокие уровни CV (см., например, фиг. 3).

Соответственно в некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена (CAR) содержит антигенспецифический связывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен CD3 $\zeta$ , причем антигенспецифический связывающий домен специфически связывается с полипептидами или пептидами цитруллинированного виментина (CV). Полипептиды CV или его пептиды подвержены посттрансляционной модификации. В некоторых вариантах





примерно 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или более костимулирующих доменов, содержащих: CD28, ICOS, OX-40 или 41BB. Внутриклеточная сигнальная область CAR или клетки по изобретению может содержать сигнальные области из одного, двух, трех, четырех или всех пяти из этих белков в дополнение к другим областям, указанным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 11 или ее вариантом, имеющим по меньшей мере примерно 50% (например, по меньшей мере примерно 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 70% (например, по меньшей мере примерно 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен 41BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 12 или ее вариантом, имеющим по меньшей мере примерно 50% (например, по меньшей мере примерно любое из 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен 41BB имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 70% (например, по меньшей мере примерно 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20.

Костимулирующие домены CAR или клетки по изобретению могут содержать костимулирующие домены как из 41BB, так и из CD28. Костимулирующий домен 41BB может располагаться ниже костимулирующих доменов CD28.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит сигнальный домен CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 10 или ее вариантом, имеющим по меньшей мере примерно 50% (например, по меньшей мере примерно 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD3 $\zeta$  имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 70% (например, по меньшей мере примерно 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит трансмембранный домен из CD28. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9 или ее вариантом, имеющим по меньшей мере примерно 50% (например, по меньшей мере примерно 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD28 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 70% (например, по меньшей мере примерно 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17.

CAR также может содержать спейсерную или шарнирную область, расположенную между антиген-связывающей областью и плазматической мембраной T-клетки. Обычно спейсер или шарнир представляет собой последовательность, происходящую из подкласса IgG: IgG1, IgG4, IgD, или CD8. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит мотив CD28. Шарнир может иметь любую длину. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит 1 аминокислоту или 10 аминокислот, или 20 аминокислот, или 50 аминокислот, или 60 аминокислот, или 70 аминокислот, или 80 аминокислот, или 100 аминокислот, или 120 аминокислот, или 140 аминокислот, или 160 аминокислот, или 180 аминокислот, или 200 аминокислот, или 250 аминокислот, или 300 аминокислот, или любое количество между ними. В некоторых вариантах осуществления спейсер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 8 или ее вариантом, имеющим по меньшей мере примерно 50% (например, по меньшей мере примерно любое из 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 70% (например, по меньшей мере примерно 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16.

CAR может дополнительно содержать линкерную область. Эта область может быть богата глицином, обеспечивающим гибкость. Линкерная область может быть богата серином и треонином для обеспечения растворимости. Линкерная область может соединяться с N-концом вариабельной тяжелой цепи (VH) с C-концом вариабельной легкой цепи (VL) или наоборот.

Антигенсвязывающий домен.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой или содержит антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой человеческие антитела, включая любые антитела, о которых известно, что они связываются с нацеливающей молекулой. Термин "антитело" в настоящем описании используется в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая антигенсвязывающие (Fab) фрагменты, F(ab')<sub>2</sub> фрагменты, Fab' фрагменты, Fv фрагменты, фрагменты рекомбинантного IgG (rIgG), переменные области тяжелой цепи (V<sub>H</sub>), способные специфически связывать антиген, одноцепочечные фрагменты антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), и фрагменты однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, нанотело, нанотело верблюда). Этот термин охватывает генно-инженерные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интраантитела, пептидные антитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконьюгатные антитела, полиспецифические, например биспецифические, антитела, диатела, триатела и тетраатела, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv. Если не указано иное, термин "антитело" следует понимать как охватывающий функциональные фрагменты антитела. Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы: IgM, IgE, IgA и IgD.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен является гуманизированным антителом или его фрагментом. "Гуманизированное" антитело представляет собой антитело, в котором все или по существу все аминокислотные остатки CDR получены из нечеловеческих CDR, и все или по существу все аминокислотные остатки FR получены из человеческих FR. Гуманизированное антитело необязательно может включать по меньшей мере часть константной области антитела, полученной из человеческого антитела. "Гуманизированная форма" нечеловеческого антитела относится к варианту нечеловеческого антитела, который был подвергнут гуманизации, как правило, для уменьшения иммуногенности у людей с сохранением специфичности и сродства родительского нечеловеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR в гуманизированном антителе замещены соответствующими остатками антитела, не являющегося человеческим (например, антитела, из которого получены остатки CDR), например, для восстановления или улучшения специфичности или сродства антитела.

В некоторых вариантах осуществления тяжелая и легкая цепи антитела могут быть полноразмерными или могут представлять собой антигенсвязывающую часть (Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv)). В других вариантах осуществления константную область тяжелой цепи антитела выбирают, например, из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE, в частности, выбирают из, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, более конкретно, из IgG1 (например, человеческого IgG1). В другом варианте осуществления константную область легкой цепи антитела выбирают, например, из каппа- или ламбда-цепи, в частности из каппа.

Среди представленных антител имеются фрагменты антител. "Фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, который содержит часть интактного антитела, связывающуюся с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают без ограничения Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; диатела; линейные антитела; переменные области тяжелой цепи (V<sub>H</sub>), молекулы одноцепочечного антитела (например, scFv), такие как scFv и однодоменные антитела, содержащие один домен V<sub>H</sub>; и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антитела. В конкретных вариантах осуществления антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи, такие как scFv.

Термин "переменная область" или "переменный домен", когда используется в отношении антитела, такого как фрагмент антитела, относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, причем каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три CDR (см., например, Kindt et al., *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., p. 91 (2007)). Одно домена V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связываются с конкретным антигеном, могут быть выделены с помощью домена V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V<sub>L</sub> или V<sub>H</sub> соответственно (см., например, Portolano et al., *J. Immunol.*, 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)).

Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие полноразмерный переменный домен тяжелой цепи или его часть, или полноразмерный переменный домен легкой цепи антитела или его часть. В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело.

Фрагменты антитела могут быть получены различными способами, включая без ограничения протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными клетками-

хозяевами. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела представляют собой фрагменты, полученные рекомбинантным методом, такие как фрагменты, содержащие конструкции, которые не встречаются в природе, например фрагменты с двумя или более областями или цепями антител, соединенными синтетическими линкерами, например пептидными линкерами, и/или которые не могут быть получены путем ферментативного расщепления природного интактного антитела. В некоторых аспектах фрагменты антител представляют собой scFv.

В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагменты антитела CAR обладают высоким сродством связывания со специфическим антигеном-мишенью или посттрансляционно модифицированными антигенами-мишенями. В вариантах осуществления изобретения повышенное сродство связывания больше, чем с контрольным антигеном.

В некоторых вариантах осуществления химерный антиген специфически связывается с пептидом CV, имеющим по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления химерный антиген специфически связывается с пептидом CV, имеющим по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления химерный антиген специфически связывается с пептидом CV, имеющим по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3 или 4.

В некоторых вариантах осуществления химерный антиген специфически связывается с пептидом CV, имеющим по меньшей мере 50% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21 или 22. В некоторых вариантах осуществления химерный антиген специфически связывается с пептидом CV, имеющим по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21 или 22. В некоторых вариантах осуществления химерный антиген специфически связывается с пептидом CV, имеющим по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21 или 22.

В некоторых вариантах осуществления химерный антиген специфически связывается с пептидом CV.

Т-клетки. Регуляторные Т-клетки (Трег) важны для поддержания гомеостаза иммунных клеток, о чем свидетельствуют катастрофические последствия генетического или физического устранения популяции Трег. В частности, клетки Трег поддерживают порядок в иммунной системе, обеспечивая доминирующую негативную регуляцию других иммунных клеток. Классифицированные в широком смысле в группу естественных или адаптивных (индуцированных) Трег; естественные Трег представляют собой CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клетки, которые развиваются и мигрируют из тимуса для выполнения своей ключевой роли в иммунном гомеостазе. Адаптивные Трег представляют собой нерегуляторные CD4<sup>+</sup> Т-клетки, которые приобретают экспрессию CD25 (IL-2R альфа) вне тимуса и обычно индуцируются воспалением и болезненными процессами, такими как аутоиммунитет и рак.

Появляется все больше доказательств того, что Трег проявляют свою функцию через множество механизмов, которые включают секрецию иммуносупрессивных растворимых факторов, таких как IL-9, IL-10 и TGF-β, опосредованную контактом с клеткой регуляцию через высокое сродство к TCR и другим костимулирующим молекулам, таким как CTLA-4, GITR, и цитолитическую активность. Под влиянием TGF-β адаптивные Трег-клетки созревают в периферических участках, включая лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистой оболочкой (MALT), из предшественников CD4<sup>+</sup> Трег, где они приобретают экспрессию маркеров, типичных для Трег, включая CD25, CTLA4 и GITR/AITR. При активации фактора транскрипции Foxp3 запускается супрессорное действие Трег клеток. Это включает секрецию цитокинов, включая IL-10 и TGF-β, которые могут вызывать остановку клеточного цикла или апоптоз в эффекторных Т-клетках, а также блокировать костимуляцию и созревание дендритных клеток.

Выделение жизнеспособных Трег клеток.

Процедуры, используемые для выделения Трег клеток, подробно описаны в приведенном ниже разделе "Примеры".

В целом регуляторные Т-клетки первоначально были идентифицированы как популяция CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клеток, способных подавлять иммунный ответ. Идентификация Foxp3 как "главного регулятора" Трег была критическим шагом в определении Трег как отдельного клона Т-клеток. Идентификация дополнительных антигенных маркеров на поверхности Трег сделала возможной идентификацию и FACS-сортировку жизнеспособных Трег до более высокой степени чистоты, позволяя получить более высокообогащенную популяцию Трег с супрессорной активностью. В настоящее время известно, что, дополнительно к CD4 и CD25, как мышиные, так и человеческие Трег экспрессируют GITR/AITR, CTLA-4, при этом экспрессируют только низкие уровни CD127 (IL-7Ra). Более того, Трег могут существовать в разных состояниях, которые можно идентифицировать по экспрессии поверхностных маркеров. Трег, которые развиваются в тимусе из CD4<sup>+</sup> тимоцитов, известны как "естественные" Трег, однако Трег также могут индуцироваться на периферии из наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в ответ на включение низких доз TCR, TGF-β и IL-2. Эти "индуцированные" Трег секретируют иммуносупрессивный цитокин IL-10. Фенотип Трег снова изменяется по мере их активации, и было показано, что маркеры, включая GARP у мышей и человека и CD103 у мышей, полезны для идентификации активированных Трег. CD45RO и CD45RA экспрессируются исключительно отдельными подмножествами CD4 клеток человека и могут использоваться для разделения человеческих CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток на три фенотипически и функционально различ-



ные субпопуляции: CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> покоящиеся Treg-клетки и CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>high</sup> активированные Treg-клетки, обе имеющие супрессорную активность *in vitro*, и провоспалительные не обладающие супрессорной активностью эффекторные CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> Т-клетки, продуцирующие цитокины (Teff).

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления выделенная Т-клетка модифицирована для экспрессии: химерного рецептора антигена (CAR), содержащего антигенсвязывающий домен, связанный по меньшей мере с одним костимулирующим доменом и сигнальным доменом CD3ζ, причем антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывается с цитруллинированным виментином (CV). В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен содержит полипептид CD28 или 41BB. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена, содержащий костимулирующий домен CD28, имеет последовательность, которая имеет по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена, содержащий костимулирующий домен 41BB, имеет последовательность, которая имеет по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена, содержащий костимулирующий домен CD28, содержит один или более компонентов CAR (например, CV-специфический связывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий домен и/или сигнальный домен CD3ζ), кодируемых последовательностью нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена, содержащий костимулирующий домен CD28, содержит один или более компонентов CAR (например, CV-специфический связывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий домен и/или сигнальный домен CD3ζ), выбранных из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере примерно 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена, содержащий костимулирующий домен 41BB содержит один или более компонентов CAR (например, CV-специфический связывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий домен и/или сигнальный домен CD3ζ), кодируемых последовательностью нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена, содержащий костимулирующий домен 41BB, содержит один или более компонентов CAR (например, CV-специфический связывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий домен и/или сигнальный домен CD3ζ), выбранных из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере примерно 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена, содержащий костимулирующий домен CD28, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена, содержащий костимулирующий домен CD28, содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере примерно 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена, содержащий костимулирующий домен 41BB, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена, содержащий костимулирующий домен 41BB, содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере примерно 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой регуляторную Т-клетку млекопитающего (Treg), причем Treg клетка является CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup>, FOXP3<sup>+</sup> и/или Helios<sup>+</sup>. В других вариантах осуществления Т-клетка представляет собой регуляторную Т-клетку (Treg) млекопитающего, причем Treg клетка является CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup> и/или FOXP3<sup>+</sup>.

Методы выделения клеток.

Для выделения клеток, таких как Treg, или клеток любого другого типа, которые можно использовать для лечения субъекта, можно использовать любое количество способов, известных в данной области. Таким образом, также представлены различные другие клетки, полученные с помощью генной инженерии, экспрессирующие химерные рецепторы антигена, например CAR. Клетки, как правило, представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, и, как правило, представляют

собой человеческие клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки, происходящие из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, представляют собой клетки иммунной системы, такие как клетки врожденного или адаптивного иммунитета, например миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, обычно Т-клетки и/или NK-клетки. Другие типичные клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, в том числе индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Клетки обычно представляют собой первичные клетки, такие как клетки, полученные непосредственно от субъекта и/или полученные от субъекта и замороженные. В некоторых вариантах осуществления клетки включают одно или более подмножеств Т-клеток или других типов клеток, таких как популяции цельных Т-клеток, CD4<sup>+</sup> клетки, CD8<sup>+</sup> клетки и их субпопуляции, такие как те, которые определяются функцией, состоянием активации, зрелостью, способностью к дифференцировке, размножению, рециркуляции, локализации и/или персистенции, антигенспецифичностью, типом антигенного рецептора, присутствием в конкретном органе или компартменте, профилем секреции маркера или цитокина и/или степенью дифференцировки. Применительно к подлежащему лечению субъекту клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. Методы также включают стандартные методы. В некоторых аспектах, например пригодных к использованию методов, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, такими как стволовые клетки, такие как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). В некоторых вариантах осуществления способы включают выделение клеток из субъекта, приготовление, обработку, культивирование и/или конструирование их, как раскрыто в настоящем описании, и повторное введение этих клеток тому же самому пациенту до или после криоконсервации.

Среди подтипов и субпопуляций Т-клеток, и/или CD4<sup>+</sup>, и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток имеются наивные Т-клетки (T<sub>N</sub>), эффекторные Т-клетки (T<sub>EFF</sub>), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как как стволовые Т-клетки памяти (T<sub>SCM</sub>), центральные Т-клетки памяти (T<sub>CM</sub>), эффекторные Т-клетки памяти (T<sub>EM</sub>) или терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой инвариантные Т-клетки (MAIT), природные и адаптивные регуляторные Т-клетки (Treg), хелперные Т-клетки, такие как T<sub>H</sub>1-клетки, T<sub>H</sub>2-клетки, T<sub>H</sub>3-клетки, T<sub>H</sub>17-клетки, T<sub>H</sub>9-клетки, T<sub>H</sub>22-клетки, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления клетки являются естественными киллерными (NK) клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки представляют собой моноциты или гранулоциты, например миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

В некоторых вариантах осуществления клетки включают одну или более нуклеиновых кислот, введенных посредством генной инженерии, и тем самым экспрессируют рекомбинантные или генно-инженерные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствующими в клетке или образце, полученном из клетки, например кислоты, полученная из другого организма или клетки, которая, например обычно не встречается в клетке, подверженной методам генной инженерии, и/или организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты не встречаются в природе, например нуклеиновая кислота, не встречающаяся в природе, включая такую, которая содержит химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из множества различных типов клеток.

Типичные способы выделения клеток и конструирования этих клеток с CAR описаны в приведенном ниже разделе "Примеры".

В некоторых вариантах осуществления получение создаваемых методом генной инженерии клеток включает одну или более стадий культивирования и/или приготовления. Клетки для введения CAR могут быть выделены из образца, такого как биологический образец, например, полученный или выделенный из субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект, из которого выделена клетка, является субъектом, имеющим заболевание или состояние или нуждающимся в клеточной терапии, или которому будет назначена клеточная терапия. Субъектом в некоторых вариантах осуществления является человек, нуждающийся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, обрабатывают и/или создают методами генной инженерии.

Соответственно клетки в некоторых вариантах осуществления являются первичными клетками, например первичными клетками человека. Образцы включают ткани, жидкости и другие образцы, взятые непосредственно у субъекта, а также образцы, полученные в результате одного или более этапов обработки, таких как разделение, центрифугирование, генная инженерия (например, трансдукция вирусным вектором), промывка и/или инкубация. Биологический образец может представлять собой образец, полученный непосредственно из биологического источника, или образец, подвергнутый обработке. Биологические образцы включают без ограничения биологические жидкости организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая обработанные образцы, полученные из них.

В некоторых аспектах образец, из которого получены или выделены клетки, представляет собой кровь или образец, полученный из крови, или является или получен из продукта афереза или лейкоафереза. Примеры образцов включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию ткани, опухоли, лейкоза, лимфомы, лимфатического узла, кишечной лимфоидной ткани, лимфоидной ткани, связанной со слизистой оболочкой, селезенки, других лимфоидных тканей, печени, легких, желудка, кишечника, толстой кишки, почки, поджелудочной железы, молочной железы, кости, предстательной железы, шейки матки, яичек, яичников, миндалин или другого органа и/или полученных из них клеток. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, например адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологичных и аллогенных источников.

В некоторых вариантах осуществления клетки получают из клеточных линий, например Т-клеточных линий. Клетки в некоторых вариантах осуществления получают из ксеногенного источника, например, от мыши, крысы, примата, не являющегося человеком, или свиньи.

В некоторых вариантах осуществления выделение клеток включает один или более этапов приготовления и/или разделения клеток, без использования аффинных методов. В некоторых примерах клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или более реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, увеличения уровня желаемых компонентов, лизирования или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах клетки разделяют на основе одного или более свойств, таких как плотность, адгезивные свойства, размер, чувствительность и/или устойчивость к конкретным компонентам.

В некоторых примерах клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, путем афереза или лейкоафереза. Образцы, в некоторых аспектах, содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах содержат клетки, отличные от эритроцитов и тромбоцитов.

В некоторых вариантах осуществления клетки крови, полученные от субъекта, промывают, например для удаления фракции плазмы, и помещают клетки в соответствующий буфер или среду для последующих этапов обработки. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления в промывочном растворе отсутствует кальций и/или магний, и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах этап промывки выполняют в полуавтоматической центрифуге с "проточным" потоком (например, клеточный процессор Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах этап промывки выполняют посредством фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления клетки ресуспендируют в различных биосовместимых буферах после промывки, таких как, например, PBS, не содержащий  $Ca^{++}/Mg^{++}$ . В определенных вариантах осуществления компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки ресуспендируют непосредственно в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления способы включают способы разделения клеток на основе плотности, например для получения лейкоцитов из периферической крови путем лизиса эритроцитов и центрифугирования в градиенте перколла или фиколла.

В некоторых вариантах осуществления способы выделения включают разделение клеток различных типов на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или более специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления может использоваться любой известный способ разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления разделение представляет собой разделение на основе сродства или иммуносродства. Например, в некоторых аспектах выделение включает разделение клеток и популяций клеток на основе экспрессии клеток или уровня экспрессии одного или более маркеров, обычно маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубации с антителом или партнером по связыванию, который специфически связывается с такими маркерами, обычно с последующими этапами промывки и отделения клеток, имеющих связанное антитело или партнера по связыванию, от тех клеток, которые не связаны с антителом или партнером по связыванию.

Такие этапы разделения могут основываться на положительном отборе, при котором связанные с реагентами клетки сохраняют для дальнейшего использования, и/или на отрицательном отборе, при котором сохраняют не связанные с антителом или партнером по связыванию клетки. В некоторых примерах для дальнейшего использования сохраняют обе фракции. В некоторых аспектах особенно полезным может быть отрицательный отбор, если нет доступных антител, которые обеспечили бы специфическую идентификацию типа клеток в гетерогенной популяции, следовательно разделение лучше всего проводить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от желаемой популяции.

Разделение не должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной клеточной популяции или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительный отбор или обогащение клеток определенного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к увеличению количества или процента таких клеток, но не обязательно к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих этот маркер. Аналогично отрицательный отбор, удаление или истощение клеток определенного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к уменьшению количества или процента

таких клеток, но не должно приводить к полному удалению всех таких клеток.

В некоторых примерах выполняют несколько раундов этапов разделения, при которых положительно или отрицательно выбранную фракцию, полученную на одном из этапов, подвергают другому этапу разделения, такому как последующий положительный или отрицательный отбор. В некоторых примерах один этап разделения может приводить к истощению клеток, экспрессирующих несколько маркеров одновременно, например, путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, каждый из которых специфичен для маркера, нацеленного на отрицательный отбор. Аналогичным образом, несколько типов клеток могут быть одновременно подвергнуты положительному отбору путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессируемых на различных типах клеток. Например, в некоторых аспектах конкретные субпопуляции Т-клеток, такие как клетки, положительные или экспрессирующие один или более маркеров, например,  $CD4^+$ ,  $CD25^+$ ,  $CD127^-$ ,  $FOXP3^+$  и/или  $Helios^+$ .

Т-клетки выделяют методами положительного или отрицательного отбора. Например,  $CD3^+$ ,  $CD28^+$  Т-клетки могут быть получены в результате положительного отбора с использованием анти- $CD28$ /анти- $CD450$ -конъюгированных магнитных гранул (например, DYNABEADS® M-450  $CD3/CD28$  T Cell Expander).

В некоторых вариантах осуществления выделение осуществляют путем обогащения конкретной популяции клеток путем положительного отбора или истощения определенной популяции клеток путем отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления положительный или отрицательный отбор осуществляют путем инкубации клеток с одним или более антителами или другим связывающим агентом, которые специфически связываются с одним или более поверхностными маркерами, экспрессируемыми (маркер "1") или экспрессируемыми на относительно более высоком уровне (маркер "1"<sup>high</sup>) на клетках, полученных в результате положительного или отрицательного отбора соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки отделяют от образца РВМС путем отрицательного отбора маркеров, экспрессируемых на не-Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие лейкоциты, такие как  $CD14$ . В некоторых аспектах этап отбора  $CD4^+$  или  $CD8^+$  используется для разделения хелперных  $CD4^+$  и цитотоксических  $CD8^+$  Т-клеток. Такие  $CD4^+$  и  $CD8^+$  популяции могут быть далее отсортированы в подпопуляции путем положительного или отрицательного отбора на основе маркеров, экспрессируемых или экспрессируемых в относительно более высокой степени в одной или более субпопуляциях наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления  $CD8^+$  клетки дополнительно обогащают или истощают по отношению к наивным клеткам, клеткам центральной памяти, эффекторным клеткам памяти и/или стволовым клеткам центральной памяти, например с помощью положительного или отрицательного отбора на основе поверхностных антигенов, связанных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления обогащение клеток центральной памяти Т ( $T_{CM}$ ) выполняют для повышения эффективности, например, для улучшения долгосрочной выживаемости, размножения и/или приживления после введения, которая в некоторых аспектах является особенно устойчивой в таких субпопуляциях (см. Terakura et al. (2012), Blood, 1:72-82; Wang et al. (2012), J. Immunother., 35(9):689-701). В некоторых вариантах осуществления объединение  $T_{CM}$ -обогащенных  $CD8^+$  Т-клеток и  $CD4^+$  Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

В некоторых вариантах осуществления обогащение Т-клеток центральной памяти ( $T_{CM}$ ) основано на положительной или высокой экспрессии на поверхности клеток  $CD45RO$ ,  $CD62L$ ,  $CCR7$ ,  $CD28$ ,  $CD3$  и/или  $CD127$ ; в некоторых аспектах оно основано на отрицательном отборе клеток, экспрессирующих или высокоэкспрессирующих  $CD45RA$  и/или гранзим В.

В некоторых аспектах применяют этап отбора на основе экспрессии  $CD4$ , используемый для получения популяции или субпопуляции  $CD4^+$  клеток с сохранением как положительных, так и отрицательных фракций, полученных после разделения на основе  $CD4$ , которые используются на последующих этапах методов, необязательно после одного или более дополнительных этапов положительного или отрицательного отбора.

В одном из примеров образец РВМС или другой образец белых кровяных клеток подвергают отбору для получения  $CD4^+$  клеток с сохранением как отрицательной, так и положительной фракций. Затем отрицательную фракцию подвергают отрицательному отбору на основе экспрессии, например  $CD14$  и  $CD45RA$ , и положительному отбору на основе маркерной характеристики Т-клеток центральной памяти, такой как  $CD62L$  или  $CCR7$ , где этапы положительного и отрицательного отбора выполняют в любом порядке.

Хелперные  $CD4^+$  Т-клетки сортируют на наивные клетки, клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации популяций клеток, которые имеют антигены клеточной поверхности.  $CD4^+$  лимфоциты могут быть получены стандартными методами. В некоторых вариантах осуществления наивные  $CD4^+$  Т-лимфоциты являются  $CD45RO^+$ ,  $CD45RA^+$ ,  $CD62L^+$ ,  $CD4^+$  Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления  $CD4^+$  клетки центральной памяти являются  $CD62L^+$  и  $CD45RO^+$ .

В одном из примеров для обогащения  $CD4^+$  клеток путем отрицательного отбора коктейль с моноклональными антителами обычно включает антитела к  $CD14$ ,  $CD20$ ,  $CD11b$ ,  $CD16$ ,  $HLA-DR$  и  $CD8$ . В

некоторых вариантах осуществления антитело или партнер по связыванию связаны с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитные микроносители или парамагнитные носители, обеспечивая разделение клеток для положительного и/или отрицательного отбора. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки и популяции клеток разделяют или выделяют, используя иммуномагнитные (или аффинно-магнитные) методы разделения (обзор которых представлен в *Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, vol.2: *Cell Behavior In Vitro and In Vivo*, p. 17-25 Edited by: S.A. Brooks and U. Schumacher© Humana Press Inc., Totowa, NJ).

В некоторых аспектах образец или композицию клеток, подлежащих разделению, инкубируют с небольшим, намагничиваемым или магнитно-чувствительным материалом, таким как магнитно-чувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные носители (например, такие как носители Dynabeads или MACS). Магнитно-чувствительный материал, например частица, обычно непосредственно или опосредованно связана с партнером по связыванию, например антителом, который специфически связывается с молекулой, например поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые требуется отделить, например, которые требуется подвергнуть отрицательному или положительному отбору.

В некоторых вариантах осуществления магнитная частица или гранула содержит магнитно-чувствительный материал, связанный с конкретным связывающим элементом, таким как антитело или другой партнер по связыванию. Существует много известных магнитно-чувствительных материалов, используемых в методах магнитного разделения. Подходящие магнитные частицы включают частицы, описанные в Molday, патенте США 4452773 и в Европейском патенте EP 452342 B, которые включены в настоящее описание в виде ссылки. Другим примером являются частицы коллоидного размера, например частицы, описанные Owen в патенте США 4795698 и Liberti et al. в патенте США 5200084.

Инкубацию обычно выполняют в условиях, при которых антитела или партнеры по связыванию, или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты, специфически связывающиеся с такими антителами или партнерами по связыванию, которые прикреплены к магнитной частице или грануле, специфически связываются с молекулами клеточной поверхности, если таковые присутствуют на клетках в образце.

В некоторых аспектах образец помещают в магнитное поле, и те клетки, на которые прикреплены магнитно-чувствительные или намагничиваемые частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от немеченых клеток. В случае положительного отбора клетки, которые притягиваются к магниту, сохраняют; в случае отрицательного отбора сохраняют клетки, которые не притягиваются (клетки без метки). В некоторых аспектах во время одного и того же этапа отбора используют комбинацию положительного и отрицательного отбора, при этом положительные и отрицательные фракции сохраняют и дополнительно обрабатывают или подвергают дополнительным этапам разделения.

В некоторых вариантах осуществления магнитно-чувствительные частицы покрывают первичными антителами или другими партнерами по связыванию, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления магнитные частицы прикрепляют к клеткам посредством покрытия первичными антителами, специфичными к одному или более маркерам. В некоторых вариантах осуществления клетки, а не носители, метят первичным антителом или партнером по связыванию, а затем добавляют магнитные частицы, покрытые вторичным антителом или другим партнером по связыванию, специфичным к типу клеток (например, стрептавидином). В некоторых вариантах осуществления магнитные частицы, покрытые стрептавидином, используют в комбинации с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

В некоторых вариантах осуществления магнитно-чувствительные частицы оставляют прикрепленными к клеткам, которые впоследствии инкубируют, культивируют и/или подвергают методам генной инженерии; в некоторых аспектах частицы остаются прикрепленными к клеткам, вводимым пациенту. В некоторых вариантах осуществления намагничиваемые или магнитно-чувствительные частицы удаляют из клеток. Способы удаления намагничиваемых частиц из клеток известны и включают, например, использование конкурирующих немеченых антител, намагничиваемых частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами, и т.д. В некоторых вариантах осуществления намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

В некоторых вариантах осуществления отбор на основе средства осуществляет посредством магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Системы магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) позволяют отбирать клетки, к которым прикреплены намагниченные частицы, с высокой чистотой. В некоторых вариантах осуществления MACS работает в режиме, в котором нецелевые и целевые виды последовательно элюируют после приложения внешнего магнитного поля. Другими словами, клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживают на месте, в то время как незакрепленные частицы элюируются. Затем, после завершения первого этапа элюирования, виды, которые были захвачены магнитным полем и не подверглись элюированию, освобождают каким-либо образом, чтобы их можно было элюировать и восстановить. В некоторых вариантах осуществления нецелевые клетки метят и выводят из гетерогенной популяции клеток.

В некоторых вариантах осуществления выделение или разделение осуществляют с помощью сис-

темы, устройства или аппарата, которые выполняют один или более этапов методов выделения, подготовки клеток, разделения, обработки, инкубации, культивирования и/или приготовления состава. В некоторых аспектах система используется для выполнения каждого из этих этапов в закрытой или стерильной среде, например, чтобы минимизировать ошибки, вмешательство пользователя и/или загрязнение. В одном из примеров система представляет собой систему, описанную в международной заявке на патент, опубликованной под номером WO 2009/072003 или US 20110003380 A1.

В некоторых вариантах осуществления система или устройство выполняет один или более, например, все этапы выделения, обработки, конструирования и приготовления состава в интегрированной или автономной системе и/или автоматизированным или программируемым образом. В некоторых аспектах система или устройство включает компьютер и/или компьютерную программу, взаимодействующую с системой или устройством, которая позволяет пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или регулировать различные аспекты этапов обработки, выделения, конструирования и приготовления состава.

В некоторых аспектах разделение и/или другие этапы осуществляют с помощью системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматического разделения клеток в масштабе клиники в закрытой и стерильной системе. Компоненты могут включать встроенный микрокомпьютер, блок магнитной сепарации, перистальтический насос и различные пережимные клапаны. Встроенный компьютер в некоторых аспектах контролирует все компоненты прибора и дает указание системе на выполнение повторяющихся процедур в стандартизированной последовательности. Блок магнитного разделения в некоторых аспектах включает перемещаемый постоянный магнит и держатель для разделительной колонки. Перистальтический насос контролирует скорость потока по всему трубопроводу и вместе с пережимными клапанами обеспечивает контролируемый поток буфера через систему и непрерывную суспензию клеток.

В системе CliniMACS в некоторых аспектах используются связанные с антителами намагничиваемые частицы, которые поставляются в стерильном непиrogenном растворе. В некоторых вариантах осуществления после мечения клеток магнитными частицами клетки промывают для удаления избыточных частиц. Затем пакет для приготовления клеток соединяют с комплектом трубок, которые, в свою очередь, соединяют с пакетом, содержащим буфер и пакетом для сбора клеток. Комплект трубок состоит из предварительно собранных стерильных трубок, включая колонку предварительного разделения и разделительную колонку, и предназначен только для однократного использования. После запуска программы разделения система автоматически вносит образец клеток в разделительную колонку. Меченые клетки удерживаются в колонке, в то время как немеченые клетки вымываются с помощью нескольких этапов промывки. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток для использования в способах, раскрытых в настоящем описании, являются немечеными и не удерживаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток для использования в способах, раскрытых в настоящем описании, являются мечеными и удерживаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток для использования в раскрытых в настоящем описании способах элюируют из колонки после удаления магнитного поля и собирают в пакет для сбора клеток.

В некоторых вариантах осуществления разделение и/или другие этапы выполняют с помощью системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy в некоторых аспектах оснащена блоком обработки клеток, который выполнен с возможностью автоматической промывки и фракционирования клеток путем центрифугирования. Система CliniMACS Prodigy может также включать встроенную камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, которое определяет оптимальную конечную точку фракционирования клеток путем определения макроскопических слоев продукта исходных клеток. Например, периферическая кровь может быть автоматически разделена на эритроциты, лейкоциты и слои плазмы. Система CliniMACS Prodigy также может включать интегрированную камеру для культивирования клеток, которая выполняет протоколы для клеточных культур, такие как, например, дифференцировка и размножение клеток, загрузка антигена и длительное культивирование клеток. Входные порты могут обеспечить стерильное удаление и пополнение среды, а клетки можно контролировать с помощью встроенного микроскопа (см., например, Klebanoff et al. (2012), *J. Immunother.*, 35(9):651-660; Terakura et al. (2012), *Blood*, 1:72-82; Wang et al. (2012), *Immunother.*, 35(9):689-701).

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, раскрытую в настоящем описании, собирают и обогащают (или истощают) методом проточной цитометрии, при котором клетки, окрашенные для множества маркеров клеточной поверхности, переносят в жидком потоке. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, раскрытую в настоящем описании, собирают и обогащают (или истощают) путем препаративной сортировки (FACS). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, раскрытую в настоящем описании, собирают и обогащают (или истощают) путем использования микросхем микроэлектромеханических систем (MEMS) в комбинации с системой обнаружения на основе FACS (см., например, WO 2010/033140, Cho et al. (2010), *Lab Chip*, 10, 1567-1573; и Godin et al. (2008), *J. Biophoton*, 1(5):355-376). В обоих случаях клетки могут быть мечеными несколькими маркерами, что позволяет выделить точно определенные подмножества Т-клеток с высокой чистотой.

В некоторых вариантах осуществления антитела или партнеры по связыванию метят одним или более детектируемыми маркерами для облегчения разделения для положительного и/или отрицательного

отбора. Например, разделение может быть основано на связывании с флуоресцентно меченными антителами. В некоторых примерах разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров по связыванию, специфичных для одного или более маркеров клеточной поверхности, осуществляют в жидком потоке, таком как флуоресцентно-активированная сортировка клеток (FACS), включая препаративную шкалу (FACS) и/или микросхемы микроэлектромеханических систем (MEMS), например, в комбинации с системой обнаружения методом проточной цитометрии. Такие методы позволяют выполнить положительный и отрицательный отбор на основе нескольких маркеров одновременно.

В некоторых вариантах осуществления способы получения включают этапы заморозки, например, криоконсервации клеток, до или после выделения, инкубации и/или конструирования. В некоторых вариантах осуществления этап заморозки и последующего оттаивания позволяет удалить гранулоциты и, в некоторой степени, моноциты из клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления клетки суспендируют в замораживающем растворе, например, после этапа промывки для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах можно использовать любое из множества известных растворов и параметров для заморозки. Один пример включает использование PBS, содержащий 20% DMSO и 8% человеческого сывороточного альбумина (HSA), или другие подходящие среды для заморозки клеток. Затем его разбавляют 1:1 средой, так что конечная концентрация DMSO и HSA составляет 10 и 4% соответственно. Затем клетки замораживают до  $-80^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1^{\circ}/\text{мин}$  и хранят в паровой фазе резервуара для хранения жидкого азота.

В некоторых вариантах осуществления предоставленные способы включают этапы культивирования, инкубации, выращивания и/или конструирования. Например, в некоторых вариантах осуществления предоставлены способы инкубации и/или конструирования популяций истощенных клеток и композиций, поддерживающих культуру клеток.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления клеточные популяции инкубируют в композиции, поддерживающей культуру клеток. Инкубацию и/или конструирование можно проводить в сосуде для культуры клеток, таком как блок, камера, лунка, колонка, пробирка, набор трубок, клапан, флакон, культуральная чашка, мешок или другой контейнер для выращивания или культивирования клеток.

В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют и/или выращивают до или в сочетании с методами генной инженерии. Этапы инкубации могут включать выращивание, культивирование, стимуляцию, активацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего агента. Такие условия включают условия, предназначенные для индуцирования пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, имитации воздействия антигена и/или праймирования клеток для генетической модификации, такой как введение рекомбинантного антигенного рецептора.

Условия могут включать одно или более из: конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, агентов, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия или агенты включают один или более агентов, например лиганд, который способен активировать внутриклеточный сигнальный домен комплекса TCR. В некоторых аспектах агент включает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке. Такие агенты могут включать антитела, такие как антитела, специфичные к TCR, например, анти-CD3. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия включают один или более агентов, например, лиганд, который способен стимулировать костимулирующий рецептор, например анти-CD28. В некоторых вариантах осуществления такие агенты и/или лиганды могут быть связаны с твердой подложкой, такой как гранула, и/или одним или более цитокинами. Необязательно способ размножения может дополнительно включать стадию добавления анти-CD3 антитела и/или анти-CD28 антитела к культуральной среде (например, в концентрации по меньшей мере примерно  $0,5 \text{ нг/мл}$ ). В некоторых вариантах осуществления стимулирующие агенты включают IL-2, IL-15 и/или IL-7. В некоторых аспектах концентрация IL-2 составляет по меньшей мере примерно 10 единиц/мл.

В некоторых аспектах инкубацию выполняют в соответствии с методами, такими как методы, описанные в патенте США № 60401, выданном Riddell et al., Klebanoff et al. (2012), *J. Immunother.*, 35(9):651-660; Terakura et al. (2012), *Blood*, 1:72-82; и/или Wang et al. (2012), *J. Immunother.*, 35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки размножают путем добавления фидерных клеток, инициирующих культуру, таких как неделящиеся мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) (например, в количестве, чтобы полученная популяция клеток содержала по меньшей мере примерно 5, 10, 20 или 40 или более РВМС фидерных клеток на каждый Т-лимфоцит в исходной популяции, предназначенной для размножения); и инкубацию культуры (например, в течение времени, достаточного для увеличения количества Т-клеток). В некоторых аспектах неделящиеся фидерные клетки могут содержать гамма-облученные фидерные клетки РВМС. В некоторых вариантах осуществления РВМС облучают гамма-лучами в диапазоне от примерно 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах фидерные клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением популяций

Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста человеческих Т-лимфоцитов, например, по меньшей мере примерно 25°C, обычно по меньшей мере примерно 30°C и обычно примерно 37°C. Необязательно инкубация может дополнительно включать добавление неделящихся EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве фидерных клеток. LCL можно облучать гамма-лучами в диапазоне от 6000 до 10000 рад. Фидерные клетки LCL в некоторых аспектах представлены в любом подходящем количестве, таком как отношение фидерных клеток LCL к исходным Т-лимфоцитам, составляющее по меньшей мере примерно 10:1.

Способы лечения.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения субъекта, у которого диагностирован ревматоидный артрит, включает выделение Т-лимфоцитов из биологического образца, полученного от субъекта; отделение регуляторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток (Treg) от обычных Т-клеток (Tconv), причем Treg клетки являются CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, а Tconv являются CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>; трансдукцию Treg клеток вектором экспрессии, кодирующим химерный рецептор антигена (CAR), который специфически связывается с антигеном, цитруллинированным виментином (CV); стимуляцию трансдуцированной Treg CV-антигеном по меньшей мере один раз *ex vivo* для получения Treg клеток, специфичных к CV-антигену; и повторную инфузию Treg субъекту, таким образом предоставляя лечение субъекту. В некоторых вариантах осуществления Treg клетки являются аутологичными клетками. CAR-Т-клетки могут быть получены из любого подходящего источника Т-клеток, известного в данной области, включая без ограничения Т-клетки, полученные от субъекта. Субъект может быть пациентом с аутоиммунным заболеванием, таким как ревматоидный артрит, нуждающимся в терапии CAR-Т-клетками, или субъектом того же вида, что и субъект с аутоиммунным заболеванием, нуждающимся в терапии CAR-Т-клетками. Собранные Т-клетки могут быть размножены *ex vivo* способами, хорошо известными в данной области, перед трансдукцией CAR для создания CAR-Т-клетки.

Антиген, цитруллинированный виментин (CV), также связан с опухолями и ХОБЛ, поэтому в некоторых вариантах осуществления способы лечения опухоли или хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) включают выделение Т-лимфоцитов из биологического образца, отделение регуляторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток (Treg) от обычных Т-клеток (Tconv), где Treg клетки являются CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, а Tconv являются CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>; трансдукцию Treg клеток вектором экспрессии, кодирующим химерный рецептор антигена (CAR), который специфически связывается с антигеном, цитруллинированным виментином (CV); стимуляцию трансдуцированных Treg с использованием CV-антигена по меньшей мере один раз *ex vivo* для получения Treg клеток, специфичных к CV-антигену; и повторную инфузию Treg субъекту, таким образом осуществляя лечение субъекта. В некоторых вариантах осуществления Treg клетки являются аутологичными клетками. CAR-Т-клетки могут быть получены из любого подходящего источника Т-клеток, известного в данной области, включая без ограничения Т-клетки, полученные от субъекта.

В данной области известны способы конструирования, доставки и экспрессии CAR в Т-клетках, а также получения популяций CAR-Т-клеток для клинического применения (см., например, Lee et al., Clin. Cancer Res., 2012, 18(10):2780-90, включенную в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки. Например, сконструированные CAR можно ввести в Т-клетки с помощью ретровирусов, которые обеспечивают эффективную и стабильную интеграцию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный рецептор антигена, в геном клетки-мишени. Пример метода с использованием лентивирусных векторов описан в приведенном ниже разделе "Примеры".

CAR могут кодироваться вектором и/или содержаться в одном или более носителях для доставки и составах, как подробно описано ниже.

Другие методы, известные в данной области, включают без ограничения лентивирусную трансдукцию, системы на основе транспозонов, прямую трансфекцию РНК и системы CRISPR/Cas (например, системы типа I, типа II или типа III с использованием подходящего Cas-белка, такого как Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e (или CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas1 Od, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1 (или CasA), Cse2 (or CasB), Cse3 (или CasE), Cse4 (или CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csz1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 и Cu1966 и т.д.).

Векторы могут включать, например, точки начала репликации, области прикрепления каркаса (SAR) и/или маркеры. Маркерный ген может придавать селективный фенотип клетке-хозяину. Например, маркер может придавать устойчивость к биоцидам, например устойчивость к антибиотикам (например, канамицину, G418, блеомицину или гигромицину). Вектор экспрессии может включать последовательность метки, предназначенную для облегчения манипуляции или обнаружения (например, очистки или локализации) экспрессируемого полипептида. Последовательности меток, такие как последовательности зеленого флуоресцентного белка (GFP), глутатион-S-трансферазы (GST), полигистидина, с-тус, гемагглютинина или FLAG™ (Kodak, New Haven, CT), обычно экспрессируются в виде слитых белков с кодируемым полипептидом. Такие метки могут быть введены в любом месте полипептида, включая кар-



боксильный или аминный конец. Другим примером является репортер EGFRt и саморасщепляемая последовательность T2A, которая расщепляется с образованием CAR, лишённого белка EGFRt. В некоторых вариантах осуществления EGFRt не требуется.

Дополнительные векторы экспрессии также могут включать, например, сегменты хромосомных, нехромосомных и синтетических последовательностей ДНК. Подходящие векторы включают производные SV40 и известные бактериальные плазмиды, например плазмиды col E1, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX, pMB9 и их производные, плазмиды, такие как RP4; фаговые ДНК, например, многочисленные производные фага  $\lambda$ , например NM989, и другие фаговые ДНК, например, M13 и нитчатые одноцепочечные фаговые ДНК; дрожжевые плазмиды, такие как плаزمида 2 $\mu$  или ее производные, векторы, используемые в эукариотических клетках, такие как векторы, используемые в клетках насекомых или млекопитающих; векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговых ДНК, таких как плазмиды, которые были модифицированы для использования с фаговой ДНК, или другие последовательности, контролирующие экспрессию.

В сочетании с выделенными последовательностями нуклеиновых кислот для систем *in vitro* (культуры клеток) и *in vivo* (животные и пациенты) можно использовать несколько способов доставки. В одном из вариантов осуществления можно использовать систему доставки на основе лентивирусного гена. Такая система предлагает стабильное, долгосрочное присутствие гена в делящихся и неделящихся клетках с широким тропизмом и позволяет осуществлять большие вставки ДНК. (Dull et al., *J. Virol.*, 72:8463-8471, 1998). В одном из вариантов осуществления в качестве способа доставки можно использовать аденоассоциированный вирус (AAV). AAV представляет собой непатогенный вирус с одноцепочечной ДНК, который в последние годы активно используется для доставки терапевтического гена в системах *in vitro* и *in vivo* (Choi et al, *Curr. Gene Ther.*, 5:299-310, 2005). AAV включают серотипы с 1 по 9. В качестве примера невирусного метода доставки можно использовать метод на основе наночастиц. Эта платформа продемонстрировала свою полезность в качестве фармацевтического средства *in vivo*. Нанотехнология улучшила трансцитоз лекарственных веществ через плотные эпителиальные и эндотелиальные барьеры. Она предлагает адресную доставку своей полезной нагрузки к клеткам и тканям, осуществляемую определенным образом (Allen and Cullis, *Science*, 303:1818-1822, 1998).

Вектор также может включать регуляторную область. Термин "регуляторная область" относится к нуклеотидным последовательностям, которые влияют на инициацию и скорость транскрипции или трансляции, а также на стабильность и/или мобильность продукта транскрипции или трансляции. Регуляторные области включают без ограничения промоторные последовательности, энхансерные последовательности, элементы ответа, сайты узнавания белка, индуцибельные элементы, связывающие белок последовательности, 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR), сайты инициации транскрипции, последовательности терминации, последовательности полиаденилирования, сигналы ядерной локализации и интроны.

Термин "функционально связанный" относится к расположению регуляторной области и последовательности, транскрибируемой в нуклеиновой кислоте, при котором обеспечивается влияние на транскрипцию или трансляцию такой последовательности. Например, чтобы кодирующая последовательность находилась под контролем промотора, сайт инициации трансляции трансляционной рамки считывания полипептида обычно располагают в пределах от одного до примерно пятидесяти нуклеотидов ниже промотора. Однако промотор может быть расположен примерно на 5000 нуклеотидов выше сайта инициации трансляции или примерно на 2000 нуклеотидов выше сайта инициации транскрипции. Промотор обычно содержит по меньшей мере коровый (базальный) промотор. Промотор также может включать по меньшей мере один контрольный элемент, такой как энхансерная последовательность, вышерасположенный элемент или вышерасположенную область активации (UAR). Выбор промоторов для включения зависит от нескольких факторов, включая без ограничения эффективность, селективность, индуцибельность, требуемый уровень экспрессии и предпочтительный уровень экспрессии в клетках или тканях. Для специалиста в данной области модулирование экспрессии кодирующей последовательности посредством соответствующего выбора и расположения промоторов и других регуляторных областей относительно кодирующей последовательности является обычным делом.

Векторы включают, например, вирусные векторы (такие как аденовирусы Ad, AAV, лентивирус, вирус везикулярного стоматита (VSV) и ретровирусы), липосомы и другие липидсодержащие комплексы, а также другие макромолекулярные комплексы, способные опосредовать доставку полинуклеотида в клетку-хозяина. Векторы также могут содержать другие компоненты или функциональные возможности, которые дополнительно модулируют доставку генов и/или экспрессию генов или иным образом обеспечивают полезные свойства целевым клеткам. Как описано и проиллюстрировано более подробно ниже, такие другие компоненты включают, например, компоненты, которые влияют на связывание или нацеливание на клетки (включая компоненты, которые опосредуют связывание клеточного типа или тканеспецифическое связывание); компоненты, влияющие на захват векторной нуклеиновой кислоты клеткой; компоненты, которые влияют на локализацию полинуклеотида в клетке после поглощения (такие как агенты, опосредующие ядерную локализацию); и компоненты, которые влияют на экспрессию полинуклеотида. Такие компоненты также могут включать маркеры, такие как детектируемые и/или селективные

маркеры, которые можно использовать для обнаружения или отбора клеток, захвативших и экспрессирующих нуклеиновую кислоту, доставленную вектором. Такие компоненты могут быть предоставлены в виде естественной особенности вектора (например, использование определенных вирусных векторов, которые имеют компоненты или функции, опосредующие связывание и захват), или векторы могут быть модифицированы для обеспечения таких функций. Другие векторы включают векторы, описанные Chen et al., *BioTechniques*, 34:167-171 (2003). В данной области известно большое количество таких векторов, которые, как правило, являются доступными. "Рекомбинантный вирусный вектор" относится к вирусному вектору, содержащему один или более гетерологичных генных продуктов или последовательностей. Поскольку многие вирусные векторы имеют ограничения по размеру, связанные с упаковкой, гетерологичные генные продукты или последовательности обычно вводят путем замены одной или более частей вирусного генома. Такие вирусы могут стать дефектными по репликации, требуя, чтобы удаленная функция(и) обеспечивалась при транспортировке во время репликации и инкапсуляции вируса (с помощью, например, вспомогательного вируса или линии упаковывающих клеток, несущих генные продукты, необходимые для репликации и/или инкапсуляции). Также описаны модифицированные вирусные векторы, в которых доставляемый полинуклеотид переносится снаружи вирусной частицы (см., например, Curiel, D.T. et al., *PNAS*, 88:8850-8854, 1991).

Дополнительные векторы включают вирусные векторы, слитые белки и химические конъюгаты. Ретровирусные векторы включают вирусы мышинного лейкоза Молони и вирусы на основе ВИЧ. Один из вирусных векторов на основе ВИЧ содержит по меньшей мере два вектора, в которых гены gag и pol происходят из генома ВИЧ, а ген env - из другого вируса. ДНК-вирусные векторы включают векторы на основе поксвирусов, такие как векторы на основе ортопоксвируса или авипоксвируса, герпесвирусные векторы, такие как вектор вируса простого герпеса I (HSV) (Geller, A.I. et al., *J. Neurochem.*, 64:487 (1995); Lim, F. et al., in *DNA Cloning: Mammalian Systems*, D. Glover, ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A.I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90, 7603 (1993); Geller, A.I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87:1149 (1990)), аденовирусные векторы (LeGal LaSalle et al., *Science*, 259:988 (1993); Davidson et al., *Nat. Genet.*, 3:219 (1993); Yang et al., *J. Virol.*, 69:2004 (1995)) и аденоассоциированные вирусные векторы (Kaplit, M.G. et al., *Nat. Genet.*, 8:148 (1994)).

Полинуклеотиды, представленные в вариантах осуществления в настоящем описании, можно использовать с носителем для микродоставки, таким как катионные липосомы и аденовирусные векторы. Обзор процедур приготовления липосом, нацеливания и доставки содержимого см. у Mannino and Gould-Fogerite, *BioTechniques*, 6:682 (1988) (см. также Feigner and Holm, *Bethesda Res. Lab. Focus*, 11(2):21 (1989); и Maurer, R.A., *Bethesda Res. Lab. Focus*, 11(2):25 (1989)).

Рекомбинантные аденовирусные векторы с дефектом по репликации могут быть получены в соответствии с известными методами (см. Quantin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:2581-2584 (1992); Stratford-Perricad et al., *J. Clin. Invest.*, 90:626-630 (1992); Rosenfeld et al., *Cell*, 68:143-155 (1992)).

Другой метод заключается в использовании векторов, продуцирующих одноцепочечную ДНК, которые могут продуцировать экспрессированные продукты внутриклеточно (см., например, Chen et al., *BioTechniques*, 34:167-171 (2003)), включенную в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки.

Последовательности нуклеиновой кислоты по изобретению могут быть доставлены в подходящую клетку субъекта. Это может быть достигнуто, например, путем использования полимерных, биоразлагаемых микрочастиц или носителей для доставки микрокапсул, размер которых позволяет оптимизировать фагоцитоз фагоцитарными клетками, такими как макрофаги. Например, можно использовать микрочастицы PLGA (полилакто-со-гликолид) диаметром приблизительно 1-10 мкм. Полинуклеотид инкапсулирован в эти микрочастицы, которые захватываются макрофагами и постепенно биоразлагаются внутри клетки, высвобождая тем самым полинуклеотид. После высвобождения ДНК экспрессируется внутри клетки. Второй тип микрочастиц предназначен не для непосредственного поглощения клетками, а для использования в первую очередь в качестве резервуара с медленным высвобождением нуклеиновой кислоты, которая поглощается клетками только после высвобождения из микрочастицы в результате биодеградации. Следовательно, эти полимерные частицы должны быть достаточно большими, чтобы предотвратить фагоцитоз (т.е. более 5 мкм и предпочтительно более 20 мкм). Другой способ добиться поглощения нуклеиновой кислоты заключается в использовании липосом, полученных стандартными методами. Нуклеиновые кислоты могут быть включены отдельно в эти средства доставки или совместно с антителами, специфичными к клетке или ткани, например, специфичными к Трег-клеткам, или посредством доставки в опухолевые клетки в качестве мишени. Альтернативно, можно получить молекулярный комплекс, состоящий из плазмиды или другого вектора, присоединенного к поли-L-лизину электростатическими или ковалентными силами. Поли-L-лизин связывается с лигандом, который может связываться с рецептором на клетках-мишенях. Доставка "голой ДНК" (т.е. без носителя для доставки) к внутримышечному, внутрикожному или подкожному участку является другим способом достижения экспрессии *in vivo*. В соответствующих полинуклеотидах (например, векторах экспрессии) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая выделенную последовательность нуклеиновой кислоты, включает последовательность, кодирующую CAR, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде наночастиц, например, наночастиц, состоящих из ядра высокомолекулярного линейного полиэтиленimina (LPEI) в комплексе с ДНК и окруженного оболочкой из модифицированного полиэтиленгликолем (ПЭГилированного) низкомолекулярного LPEI. Нуклеиновые кислоты и векторы также могут быть нанесены на поверхность устройства (например, катетера) или содержаться внутри насоса, пластыря или другого устройства для доставки лекарственного вещества. Раскрытые в настоящем описании нуклеиновые кислоты и векторы можно вводить по отдельности или в смеси в присутствии фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества или носителя (например, физиологического раствора). Наполнитель или носитель выбирают в зависимости от режима и пути введения. Подходящие фармацевтические носители, а также необходимые фармацевтические средства для использования в фармацевтических составах описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (EW Martin), хорошо известном в этой области справочнике, и в USP/NF (United States Pharmacopeia and the National Formulary).

В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть составлены в виде наночастиц с инкапсулированными композициями, описанными в настоящем описании в вариантах осуществления.

Независимо от того, вводят ли композиции в виде нуклеиновых кислот или полипептидов, они составлены для обеспечения способствовать их захвата клеткой млекопитающего. Полезные векторные системы и составы описаны выше. В некоторых вариантах осуществления вектор может доставлять композиции к конкретному типу клеток. Однако изобретение не ограничено этим, и также рассматриваются другие способы доставки ДНК, такие как химическая трансфекция, с использованием, например, фосфата кальция, DEAE-декстрана, липосом, липоплексов, поверхностно-активных веществ и перфторхимических жидкостей, а также способы физической доставки, такие как в виде систем электропорации, микроинъекции, баллистических частиц и "генной пушки".

В других вариантах осуществления композиции содержат клетку, которая была трансформирована или трансфицирована одним или более векторами или нуклеиновыми кислотами, кодирующими один или более CAR. В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению можно применять *ex vivo*. Другими словами, клетки субъекта могут быть взяты из организма и трансдуцированы композициями в культуре с желаемым антигеном-мишенью, затем специфичные к антигену-мишени, например, Т-клетки могут быть размножены, и размноженные клетки возвращены в тело субъекта. Клетка может быть клеткой субъекта или соответствовать гаплотипу или клеточной линии. Клетки можно облучать для предотвращения репликации. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой совместимые с человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA) аутологичные линии клеток или их комбинации. В других вариантах осуществления клетки могут быть стволовыми клетками, например, эмбриональной стволовой клеткой или искусственной плюрипотентной стволовой клеткой (индуцированной плюрипотентной стволовой клеткой (iPS-клетка)). Эмбриональные стволовые клетки (ES-клетки) и искусственные плюрипотентные стволовые клетки (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, iPS-клетки) были получены от многих видов животных, включая человека. Эти типы плюрипотентных стволовых клеток были бы наиболее полезным источником клеток для регенеративной медицины, потому что эти клетки способны дифференцироваться почти во все органы путем соответствующей индукции их дифференцировки, при этом сохраняя свою способность активно делиться при сохранении своей плюрипотентности. В частности, iPS-клетки могут быть получены из аутогенных соматических клеток и поэтому вряд ли будут вызывать этические и социальные проблемы по сравнению с ES-клетками, которые образуются в результате разрушения эмбрионов. Кроме того, iPS-клетки, которые являются аутогенными клетками, позволяют избежать реакции отторжения, что является самым большим препятствием для регенеративной медицины или трансплантационной терапии.

CAR можно легко доставить субъекту способами, известными в данной области, например методами доставки мРНК. Таким образом, молекулы CAR можно использовать в клинической практике, подобно подходам, используемым в современной генной терапии. В частности, могут быть разработаны стволовые клетки со стабильной экспрессией CAR или iPS-клетки для терапии трансплантации клеток, а также вакцинации для использования у субъектов.

После размножения *ex vivo* CAR-Т-клетки могут быть повторно введены субъекту путем инфузии в терапевтически эффективном количестве. В одном из вариантов осуществления CAR-Т-клетки стимулируют с помощью анти-CD3/CD28 гранул для их размножения *in vitro*. CAR-Т-клетки можно использовать в ответ на антиген аутоиммунного заболевания (например, цитруллинированный виментин (CV)). Используемый в настоящем описании термин "терапевтически эффективное количество" означает количество CAR-Т-клеток, вводимых млекопитающему, в частности, нуждающемуся в таком лечении человеку, достаточное для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит.

Точное количество CAR-Т-клеток для введения может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, весе, степени заболевания и состоянии субъекта.

Обычно применение Т-клеточной терапии определяется количеством клеток на килограмм веса тела. Однако, поскольку Т-клетки будут реплицироваться и размножаться после переноса, введенная доза клеток не будет напоминать конечное стационарное количество клеток.

В одном из вариантов осуществления фармацевтическую композицию, содержащую CAR-Т-клетки

по настоящему изобретению, можно вводить в дозе от  $10^4$  до  $10^8$  клеток/кг веса тела. В другом варианте осуществления фармацевтическую композицию, содержащую CAR-T-клетки по настоящему изобретению, можно вводить в дозе от  $10^4$  до  $10^8$  клеток/кг веса тела, включая все целые значения в этих диапазонах.

Композиции, содержащие CAR-T-клетки по настоящему изобретению, также можно вводить многократно в этих дозировках. Клетки можно вводить способами инфузии, известными в данной области (см., например, Rosenberg et al., 1988, *New England Journal of Medicine*, 319:1676). Оптимальная дозировка и схема лечения для конкретного субъекта могут быть легко определены специалистом в данной области путем наблюдения за пациентом на предмет признаков заболевания и соответствующей коррекции лечения.

В некоторых вариантах осуществления введение любой из композиций, представленных в вариантах осуществления в настоящем описании, например CV-CAR-T-клеток для лечения аутоиммунного заболевания, может быть объединено с другими методами лечения с использованием клеток, например, стволовых клеток, антигенпрезентирующих клеток и т.д.

Композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена способами, известными в данной области, и такие композиции подходят для парентерального введения млекопитающим, особенно людям, и содержат терапевтически эффективное количество только композиции с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" в контексте настоящего описания означает любые подходящие носители, разбавители или вспомогательные вещества. К ним относятся все водные и неводные изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы и растворенные вещества, которые делают композицию изотоничной крови предполагаемого реципиента; водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты и загустители, дисперсионные среды, противогрибковые и антибактериальные агенты, изотонические и абсорбирующие агенты и т.п. Следует понимать, что композиции по изобретению также могут включать другие дополнительные физиологически активные агенты.

Носитель должен быть фармацевтически "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместимым с другими ингредиентами композиции и не должен причинять вреда субъекту. Композиции включают композиции, подходящие для парентерального введения, включая подкожное, внутримышечное, внутрисуставное, внутривенное и внутрикожное введение. Композиции могут быть представлены в удобной единичной дозирующей форме и могут быть приготовлены любым способом, хорошо известным в области фармации. Такие способы включают подготовку носителя для ассоциации с CAR-T-клетками. Как правило, композиции получают путем однородного и тщательного объединения любых активных ингредиентов с жидкими носителями.

В некоторых вариантах осуществления композиция является подходящей для парентерального введения. В другом варианте осуществления композиция является подходящей для внутривенного применения. В другом варианте осуществления композиция является подходящей для внутрисуставного введения.

Составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные, изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактерицидные агенты и растворенные вещества, которые делают состав изотоничным крови предполагаемого реципиента; а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты и загустители.

Изобретение также относится к комбинации композиции по настоящему изобретению с другими лекарственными средствами и/или применению дополнительно к другим схемам лечения или методам, таким как хирургическое вмешательство. Когда композицию по настоящему изобретению используют в комбинации с известными терапевтическими агентами, комбинацию можно вводить либо последовательно (либо непрерывно, либо разбивая на периоды с перерывами лечения), либо одновременно, либо в виде смеси. В случае аутоиммунных заболеваний, например ревматоидного артрита, лечение включает введение субъекту композиций, представленных в вариантах осуществления в настоящем описании, например аутологичных T-клеток, трансдуцированных CAR, специфичным к цитруллинированному виментину (CV), и одного или более противовоспалительных агентов и/или терапевтических агентов. Противовоспалительные агенты включают одно или более антител, которые специфически связываются с провоспалительными цитокинами, например провоспалительными цитокинами, такими как IL-1, TNF, IL-6, GM-CSF и IFN- $\gamma$ . В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой анти-TNF $\alpha$ , анти-IL-6 или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления можно вводить один или более агентов, отличных от антител, которые уменьшают количество провоспалительных цитокинов, таких как нестероидные противовоспалительные средства (NSAID). Можно вводить любую комбинацию антител и одного или более агентов, которые уменьшают количество провоспалительных цитокинов.

Комбинированное лечение также включает лечение либо композицией по изобретению с последующим предоставлением известного лечения, либо лечение известным агентом с последующим лечением композицией по изобретению, например, в качестве поддерживающей терапии. Например, при лечении аутоиммунных заболеваний центральную роль в патогенезе аутоиммунных воспалительных реакций при ревматоидном артрите (РА), воспалительном заболевании кишечника (ВЗК), болезни Крона (БК) и

анкилозирующего спондилита (АС) играют чрезмерная и длительная активация иммунных клеток, таких как Т- и В-лимфоциты, и сверхэкспрессия основного провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли альфа (TNF) вместе с другими медиаторами, такими как интерлюкин-6 (IL-6), интерлюкин-1 (IL-1) и гамма-интерферон (IFN- $\gamma$ ).

Нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID), глюкокортикоиды, модифицирующие заболевание противоревматические лекарственные средства (DMARD) традиционно используются при лечении аутоиммунных воспалительных заболеваний. NSAID и глюкокортикоиды эффективны для облегчения боли и подавления воспаления, тогда как DMARD обладают способностью уменьшать повреждение тканей и органов, вызванное воспалительными реакциями. Совсем недавно в лечении РА и других аутоиммунных заболеваний произошла революция, когда было обнаружено, что TNF критически важен в развитии заболеваний. Анти-TNF биопрепараты (такие как инфликсимаб, адалимумаб, этанерцепт, голимумаб и цертолизумаб пепол) заметно улучшили результаты лечения аутоиммунных воспалительных заболеваний.

Нестероидные противовоспалительные средства обладают анальгезирующим, жаропонижающим и противовоспалительным действием, часто используемым для лечения таких состояний, как артрит и головные боли. NSAID снимают боль, блокируя ферменты циклооксигеназы (COX). COX способствует выработке простагландинов, медиатора, вызывающего воспаление и боль. Хотя NSAID имеют разную химическую структуру, все они обладают одинаковым терапевтическим эффектом, например, подавлением аутоиммунных воспалительных реакций. В целом NSAID можно разделить на две широкие категории: традиционные неселективные NSAID и селективные ингибиторы циклооксигеназы-2 (COX-2) (см. обзор в P. Li et al., *Front Pharmacol.*, 2017, 8:460).

В дополнение к анти-TNF средствам, также были широко изучены и активно разрабатывались биопрепараты, нацеленные на другие провоспалительные цитокины или иммунокомпетентные молекулы. Например, абатацепт, полностью гуманизированный слитый белок внеклеточного домена CTLA-4 и Fc-фракции IgG1, был одобрен для пациентов с РА с неадекватным ответом на анти-TNF терапию. Основным иммунологическим механизмом абатацепта является селективное ингибирование пути костимуляции (CD80 и CD86) и активация Т-клеток. Тоцилизумаб, гуманизированное моноклональное антитело к IL-6 рецептору, было одобрено для пациентов с РА, не переносящих DMARD и/или анти-TNF биопрепараты. Это терапевтическое mAb блокирует трансмембранную передачу сигналов IL-6 посредством связывания с растворимыми и мембранными формами рецептора IL-6. Биологические препараты, нацеленные на IL-1 (анакинра), Th1 иммунные ответы (IL-12/IL-23, устекинумаб), Th17 иммунные ответы (IL-17, секукинумаб) и CD20 (ритуксимаб) также были одобрены для лечения аутоиммунных заболеваний (см. обзор в P. Li et al., *Front Pharmacol.*, 2017, 8:460).

Хотя при применении на практике или тестировании настоящего изобретения могут быть использованы способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, ниже приведено описание подходящих способов и материалов. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие цитируемые документы, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки. В случае конфликта преимущество имеет настоящее описание изобретения, включая определения. К тому же материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения изобретения.

### Примеры

Пример 1. Создание лентивирусных векторов, экспрессирующих CF-CAR.

Выполняли анализ различных элементов, играющих важную роль в эффективности CAR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сравнивали три разные версии scFv, две длины шарнира и анализировали два разных костимулирующих домена. На каждом из этих этапов выбирали один из кандидатов CV-CAR, который обеспечивал наилучший профиль активации Т-клеток.

Создание CV-специфичного scFv: Вариабельные области тяжелой и легкой цепи антитела BVCA1 секвенировали и использовали для создания CV-специфичного гена scFv в формате V<sub>H</sub>-линкер-V<sub>L</sub>. Белок scFv получали путем вставки последовательности в плазмиду pSYN, которую инокулировали в компетентные клетки DH5-альфа E.coli. Одну колонию выращивали в 5 мл среды 2YT с добавлением 2% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина в течение ночи при 30°C на шейкере. 5 мл культуры O/N инокулировали в 500 мл свежей среды 2YT (содержащей 0,1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина) и инкубировали при 37°C в течение 2,5 ч до достижения OD<sub>600</sub>=0,9. Экспрессию scFv индуцировали добавлением 250 мкл изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид (IPTG) и затем инкубировали при 30°C в течение 4 ч при встряхивании. После 20 мин центрифугирования при 5000 об/мин бактериальный осадок ресуспендировали в 12,5 мл ледяного периплазматического буфера для экстракции (PPB, 200 г/л сахарозы, 30 мМ трис-HCl, pH 8,0) и хранили на льду O/N. На следующий день бактерии центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 мин, супернатант сохраняли, осадок ресуспендировали с 12,5 мл 5 мМ ледяного Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и держали на льду в течение 30 мин, чтобы вызвать осмотический шок. Лизированные бактерии центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 мин, и супернатант объединяли с предыдущим. Затем CV-специфический scFv очищали с помощью Ni-NTA хроматографии.

Оценка специфичности связывания и сродства антител BVCA1 и scFv к пептиду CV. Специфичность связывания IgG и scFv BVCA1 оценивали с помощью ELISA. 96-луночные планшеты для ELISA покрывали O/N при 4°C 50 мкл стрептавидина в концентрации 10 мкг/мл. Лунки промывали три раза и блокировали 200 мкл 1× PBS и 1% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре и снова промывали. Добавляли 100 мкл биотинилированных пептидов в концентрации 10 мкг/мл, разведенных в PBS и 1% BSA, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем лунки трижды промывали. Добавляли 100 мкл IgG или scFv BVCA1 или изотипического контроля в различных концентрациях (серийное разведение). После 1,5 ч инкубации при комнатной температуре лунки промывали 3 раза и добавляли туда соответствующее вторичное антитело, конъюгированное с щелочной фосфатазой (AP): для полностью человеческого IgG BVCA1 использовали козье Ab-AP к человеческому IgG (Life Technologies № 62-8422) в разведении 1/5000, для химерной версии Ab BVCA1 с мышинными доменами CH2 и CH3 IgG2a использовали козье Ab-AP к мышинному IgG (цельная молекула) (Sigma #A3562) при разведении 1/10000, для scFv BVCA1, использовали анти-с-Мус Ab (клон 9E10, мышинный IgG1; Santa Cruz Biotech, sc-40) при разведении 1/200 с последующим добавлением антимишиного IgG-AP (Sigma, A3562) при разведении 1/10000. Лунки трижды промывали и добавляли 100 мкл раствора субстрата Step pNPP. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 3M NaOH через 15-30 мин, и оптическую плотность считывали на считывающем устройстве для микропланшетов при 405 нм. Кинетику и сродство Ig и scFv BVCA1 к пептиду CV анализировали с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием Biacore T100 (GE healthcare). Биотинилированный пептид CV иммобилизовали на сенсорном чипе, покрытом стрептавидином (CM5). Различные концентрации антител вводили со скоростью 30 мкл/мин.

Создание CV-специфических конструкций CAR. С помощью метода сборки Гибсона (Gibson Assembly Master Mix, BioLabs, в соответствии с инструкциями производителя) последовательность анти-CD19 scFv заменяли на CV-специфическую последовательность scFv в уже существующих 19-CAR конструкциях, клонированных в лентивирусную плазмиду p10001 с предпочтительными внутриклеточными доменами CD28z или 41BBz, за которыми расположены домен CD3ζ и усеченная версия EGFR (EGFRt), используемая в качестве рецептора и отделенная от CAR доменом T2A (конструкции CAR были предоставлены Juno Therapeutics). Эти конструкции CAR имели короткий шарнир (IgG4-36 пар оснований), в связи с этим снова использовали метод сборки Гибсона для замены короткого шарнира длинным (117 пар оснований) внеклеточного домена последовательности CD28 человека). Таким образом, создавали несколько CV-специфических конструкций CAR с коротким или длинным шарниром и костимулирующими доменами 41BB или CD28.

Трансфекция клеток НЕК 293Т и титрование лентивирусных частиц. Клетки НЕК 293Т высевали по 800000 клеток на лунку в 6-луночный планшет с 2 мл среды DMEM с высоким содержанием глюкозы, дополненной 10% FBS (без антибиотиков), и оставляли при 37°C в условиях 5% CO<sub>2</sub> на ночь. При достижении в лунках 80% слияния в каждую лунку осторожно по каплям добавляли смесь 1,5 мкг CV-CAR p10001 с 1,33 мкг упаковывающего вектора p8.91, 0,168 мкг вектора pMD2.G оболочки VSV и 9 мкг реагента для трансфекции FuGENE HD (Promega). Для повышения эффективности продуцирования вирусных частиц через 14 ч среду заменяли свежей средой с высоким содержанием глюкозы 10% FBS-DMEM, дополненной реагентом ViralBoost (разбавленным до 1/500; VC-100, Alstem). Супернатант вируса собирали через 2 дня и концентрировали в 100 раз с помощью раствора для преципитации лентивируса (VP100, Alstem, соблюдая инструкции производителя). Эффективность трансфекции клеток НЕК 293Т оценивали с помощью проточной цитометрии, используя анти-EGFRt антитела (Erbix, Juno Therapeutics). Для титрования лентивирусных частиц клетки Jurkat (10000 на лунку в 96-луночном планшете) помещали в культуру с серийным разведением вируса на 4 дня, затем окрашивали анти-EGFRt антителами и анализировали с помощью проточной цитометрии (LSR II; BD Biosciences). Разведения, дающие от 1 до 20% положительных клеток, использовали для определения титра вируса согласно следующему уравнению:

$$\frac{[\text{Количество клеток-мишеней} \times (\% \text{ EGFRt}^+ \text{ клеток}/100)]}{\text{объем супернатанта (мл)}}$$

На фиг. 19 показана оценка CV-специфической экспрессии CAR на поверхности клеток НЕК 293Т в день 3 после трансфекции. Методы, которые использовали для трансфекции клеток НЕК 293Т и титрования лентивирусных частиц, описаны выше.

Пример 2. Создание лентивирусных векторов, экспрессирующих CV-CAR.

Создание конструкции CV-CAR. Для создания конструкции CV-CAR, экспрессируемой в лентивирусном векторе, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) конструкции CD19-CAR, присутствующей в плазмиде p10001 лентивирусного остова (доступной от Juno Therapeutics, Inc.) заменяли scFv BVCA1 с помощью метода сборки Гибсона (фиг. 8А и 8В). Поскольку между аминокислотными последовательностями виментина человека и мыши имеются лишь некоторые различия, анти-CV-антитело проявляет высокую специфичность как в отношении человеческих, так и мышинных пептидов. Это позволяет выполнить оценку как на человеческих образцах *in vitro*, так и на мышинной модели PA *in vivo*. Фиг. 6, иллюстрирующая выравнивание частей человеческого пептида виментина и мышинного пептида виментина, объясняет, почему моноклональное антитело BVCA1 является специфичным как к челове-

скому, так и мышиному цитруллинированному виментину. На фиг. 7 показана оценка специфичности анти-CV антитела (BVCA1). На фиг. 4 показана оценка специфичности и сродства одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), синтезированного из антитела BVCA1, к CV. На фиг. 5 показано, что (фиг. 5A) константа диссоциации ( $K_D$ ) между полностью человеческим IgG BVCA1 и человеческим пептидом CV составляет примерно 10 нМ и что (фиг. 5B)  $K_D$  между scFv BVCA1 и человеческим пептидом CV составляет примерно 198 нМ. Результаты свидетельствуют о том, что, как и антитело BVCA1, так и scFv BVCA1 является специфичным к цитруллинированному виментину.

Как показано на фиг. 8B, были созданы две версии CV-специфического CAR, каждая из которых содержала CD3 $\zeta$  плюс либо костимулирующий домен CD28 (CV.28z-CAR), либо 41BB (CV.41BBz-CAR). Конструкция CV-CAR в соответствии с описанными вариантами осуществления может иметь костимулирующие домены любого подходящего типа(ов). Укороченный вариант гена EGFR, отделенный от CAR пептидом T2A, использовали в качестве репортерного гена. Lentивирусные частицы получали путем трансфекции T-клеток НЕК 293. Супернатант собирали на 3 день, и вирусные частицы осаждали для обогащения.

На фиг. 9 показан пример временной шкалы создания конструкций CV-CAR и последующей оценки созданных конструкций. В настоящем раскрытии подробно описаны и проиллюстрированы различные этапы создания и оценки конструкций.

Оценка шарниров разной длины в конструкциях CF-CAR. Сравнивали конструкции с шарнирами двух разных длин: (1) коротким шарниром, полученным из мотива IgG4; и (2) длинным шарниром, который является частью внеклеточного домена человеческого CD28. Было обнаружено, что как в случае CV.28z-CAR, так и в случае CV.41BBz-CAR присутствие длинного шарнира индуцирует более эффективную активацию T-клеток CV-CAR. В зависимости от антигена-мишени конструкции CAR можно определить оптимальную длину шарнира, позволяющую обеспечить надлежащее связывание антигена. Чтобы оценить, какая длина шарнира является оптимальной для активации CV-специфической CAR-Treg, сравнивали два разных шарнира - короткий шарнир, IgG4 (36 пар оснований), и длинный шарнир, созданный с использованием части внеклеточного домена человеческого CD28 (117 пар оснований). Для изучения этих двух разных шарниров как в CV-CAR с внутриклеточным доменом CD28z, так и в CV-CAR с внутриклеточным доменом 41BBz создавали четыре версии конструкции CV-CAR: две с коротким шарниром (CV-IgG4-28z и CV-IgG4-41BBz) и две с длинным шарниром (CV-CD28-28z и CV-CD28-41BBz). Экспрессию этих различных конструкций CV-CAR в Treg индуцировали лентивирусной трансдукцией, и анализировали профиль активации Treg CV-CAR после повторной стимуляции в присутствии CV-SA гранул. Как показано на фиг. 10A, на 3-й день маркер активации CD71 в популяциях CV-CAR-Treg, экспрессирующих конструкцию CAR с длинным шарниром, был экспрессирован более высоким процентом клеток по сравнению с клетками с коротким шарниром. То же самое наблюдение можно сделать при оценке средней интенсивности флуоресценции (MFI) CD25 на 3-й день. Более того, Treg CV-CAR с длинным шарниром размножались более эффективно, чем с коротким шарниром (фиг. 10B).

Оценка различных версий scFv. Согласно изобретению был разработан новый scFv, BVCA1, который специфически связывается с цитруллинированным белком виментином. Большинство антител, нацеленных на цитруллинированные белки, обнаруживаемые у пациентов с РА, являются менее специфичными и перекрестно реагируют с несколькими цитруллинированными белками. Таким образом, для дальнейшего анализа использовали BVCA1. Однако из этого единственного IgG создавали три версии scFv: (1) одну с цепями  $V_L$  и  $V_H$  с исходной нуклеотидной последовательностью с линкером из 24 аминокислот (scFv #1); (2) одну с исходной нуклеотидной последовательностью и линкером (GGGGG)<sub>3</sub> (scFv #2); и (3) третью с кодон-оптимизированной последовательностью цепей  $V_L$  и  $V_H$  с линкером (GGGGG)<sub>3</sub> (scFv #3).

Как показано на фиг. 11A-11D, только CV-CAR с scFv #1 эффективно экспрессировался на поверхности клеток Treg и Tconv на 3-й день после трансдукции, тогда как экспрессия репортерного гена предполагала эффективность трансдукции, сравнимую между тремя различными конструкциями CAR (фиг. 11A и 11B). В день 2 после повторной стимуляции в присутствии CV-per-SA гранул (CV гранул) наблюдали более высокий процент клеток, экспрессирующих маркеры активации CD71 и CD69, в популяции Treg, ранее трансдуцированной CV-CAR scFv #1, по сравнению с двумя другими группами CV-CAR-Treg (фиг. 11C и 11D). На основании этих результатов для продолжения разработки конструкций CV-CAR была выбрана конструкция CV-CAR с scFv #1.

Пример 3. Создание CV-CAR-трансдуцированных человеческих Treg и Tconv.

Получение образцов, сортировка и стимуляция клеток *in vitro*. Образцы свежей цельной крови получали от здоровых доноров из общей популяции в Калифорнийском университете в Сан-Франциско или из StemCell Technologies. PBMC выделяли осаждением в градиенте плотности с помощью среды Ficoll Paque (GE healthcare). CD4<sup>+</sup> T-клетки обогащали с помощью положительного отбора из PBMC, используя магнитную сортировку клеток (Miltenyi Biotec). Затем CD4<sup>+</sup> T-клетки окрашивали мечеными флуорохромом mAb, специфичными к CD4, CD25 и CD127, и разделяли проточной цитометрией (FACS Aria; BD Biosciences) на две подгруппы: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (регуляторные CD4<sup>+</sup> T-клетки; Treg) и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> (обычные CD4<sup>+</sup> T-клетки; Tconv) с чистотой выше 97%. После этого отсортированные популяции клеток стимулировали Dynabeads, покрытыми анти-CD3/анти-CD28 (ThermoFisher Scientific) в соот-

ношении 1:1 для Tconv и 1 клетка на 2 гранулы для Treg в присутствии интерлейкина-2 (IL-2; Proleukin, Prometheus Laboratories; 100 ед/мл для Tconv и 300 ед/мл для Treg) в среде для Т-клеток: среда RPMI 1640 с добавлением 5 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин, по 50 мг/мл каждого пенициллина/стрептомицина (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния), 5 мМ заменимых аминокислот, 5 мМ пирувата натрия (Mediatech) и 10% FBS (Invitrogen). Свежую среду, содержащую IL-2, добавляли каждые 2 дня, и при необходимости клетки разделяли.

Лентивирусная трансдукция популяций Tconv и Treg и оценка эффективности трансдукции. В день 2 после стимуляции отсортированных CD4<sup>+</sup> популяций клетки подсчитывали и высевали по 250000-500000 клеток на лунку в 24-луночный планшет и помещали в инкубатор при 37°C на по меньшей мере 1 ч. Затем в лунки добавляли смесь вирусных частиц и сульфата протамина (100 мкг/мл) для достижения множественности заражения (MOI) 1 частица на клетку. Затем клетки центрифугировали в течение 30 мин при 1200g при 32°C. После этого планшет снова помещали на 90 мин при 37°C. Скорость вращения клеток замедляли на 5 мин и инокулянтную среду заменяли свежей, содержащей IL-2. Через три дня эффективность трансдукции определяли проточной цитометрией с помощью анти-EGFRt антител. Для подтверждения того, что процент EGFRt<sup>+</sup> клеток является показателем экспрессии CAR на клеточной поверхности этих клеток клетки окрашивали комбинацией анти-EGFRt Ab, конъюгированными с APC или PE, с тетрамером CV-стрептавидин (SA)-AF488, инкубировали в течение 2 ч при 4°C при перемешивании и анализировали проточной цитометрией в день 4 после трансдукции. Комплекс CV-SA-AF488 получали непосредственно перед окрашиванием клеток путем совместной инкубации биотинилированного пептида CV (Innovagen) с конъюгированным SA-AF488 (Life Technologies) при соотношении белка SA к биотинилированным пептидам 1 к 4 в течение 15 мин при 4°C при перемешивании и путем вращения пробирки при высокой скорости 14000g в течение 5 мин.

#### Результаты.

Используя лентивирусные векторы CV-CAR, человеческие регуляторные CD4<sup>+</sup> Т-клетки (Treg) и обычные (Tconv) клетки трансдуцировали в соотношении 1 вирус на 1 клетку. Эти клетки выделяли из периферической крови здоровых доноров (HD), отсортировывали с помощью проточной цитометрии на основании экспрессии CD4, CD25 и CD127 (Treg: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>; Tconv: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>) и стимулировали в течение 2 дней с анти-CD3/CD28 гранулами перед трансдукцией. Клетки также трансдуцировали CD19.28z-CAR и CD19.41BBz-CAR, используя их в качестве контроля.

В день 4 после трансдукции процент клеток EGFRt<sup>+</sup> определяли с помощью анти-EGFRt антитела. Данные показали, что трансдукция CV-CAR и CD19-CAR приводила к аналогичному проценту EGFRt<sup>+</sup> среди Treg и среди популяций Tconv (фиг. 12A). Более того, для всех протестированных CAR трансдукция Treg была более эффективной, чем Tconv. Таким образом, в одном эксперименте от примерно 74% до примерно 80% Treg были EGFRt<sup>+</sup> в зависимости от конструкции CAR, по сравнению с от примерно 53% до примерно 59% в популяциях Tconv (фиг. 12A). Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) также была выше у EGFRt<sup>+</sup> Treg по сравнению с EGFRt<sup>+</sup> Tconv, как показано в примере на фиг. 12B.

Для подтверждения того, что экспрессия EGFRt является показателем экспрессии CAR на поверхности клетки и для оценки способности конструкций CV-CAR связывать свой антиген-мишень, клетки окрашивали биотинилированным пептидом CV/тетрамером стрептавидина, конъюгированного с FITC (CVper-SA-FITC), показанным на фиг. 12C и антителом к EGFRt. Данные подтвердили, что экспрессия EGFRt коррелировала с экспрессией CV-CAR на поверхности Treg, и доказали, что способность scFv BVCA1 связывать CV сохраняется после вставки в конструкцию CV-CAR (фиг. 12D). Аналогичные результаты были получены для клеток Tconv. Результаты свидетельствуют о том, что CV-специфические CAR, экспрессируемые на поверхности Treg, специфически связываются с пептидом CV.

#### Пример 4. Анализ влияния передачи сигналов CV-CAR на активацию и размножения Treg in vitro.

Получение клеток для второго раунда стимуляции: Во избежание остаточной активации клеток из-за присутствия гранул Dynabeads, покрытых анти-CD3/анти-CD28, эти гранулы удаляли из культур клеток на 7 день с помощью магнита (ThermoFisher Scientific, в соответствии с инструкциями производителя). Кроме того, при наличии показаний популяции CAR<sup>+</sup> Treg и Tconv сортировали на основе экспрессии EGFRt с помощью проточной цитометрии на 7 день.

Повторная стимуляция Т-клеток CV-CAR. После первой стимуляции CAR<sup>+</sup> Т-клетки повторно стимулировали на 9 или 10 день. Для сравнения профилей активации CV-CAR-Т-клеток при стимуляции посредством CAR или их эндогенного TCR использовали разные условия стимуляции. Гранулы, представляющие пептиды CV, получали путем связывания пептидов биотинилированного CV (Innovagen) со стрептавидином Dynabeads M-280 (Invitrogen, согласно инструкциям производителя), называемые гранулами CV-SA. Клетки повторно стимулировали в присутствии IL-2 (100 ед/мл для Tconv и 300 ед/мл для Treg) и в отсутствие или в присутствии гранул Dynabeads, покрытых анти-CD3/анти-CD28, в соотношении 1:1 или CV-SA гранул в соотношении 2 гранулы на 1 клетку. Свежую среду, содержащую IL-2, добавляли каждые 2 дня, и при необходимости клетки разделяли.

Изучение профиля активации и размножения CV-CAR-Т-клеток после второго раунда стимуляции. В первый день после повторной стимуляции клеток кластеры клеток визуализировали с помощью мик-



роскопа с ярким полем. В дни 2 и 3 небольшую фракцию клеток из каждого условия стимуляции собирали и окрашивали антителами к CD4, CD25, CD69, CD71, EGFRt и фиксируемым синим красителем LIVE/DEAD (Invitrogen) и инкубировали 20 мин при 4°C. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии путем отбора LIVE CD4<sup>+</sup> клеток. Для измерения кратности увеличения CV-CAR-Treg после повторной стимуляции выполняли обогащение CV-CAR<sup>+</sup> клеток с помощью проточной цитометрии перед вторым раундом стимуляции (на 7 день после первой стимуляции). Эти отсортированные CV-CAR<sup>+</sup> Treg подсчитывали на 5 день после повторной стимуляции и рассчитывали кратное увеличение (количество клеток в день 5/количество клеток в день 0).

Оценивали опосредованную сигналом способность CAR в созданных CV-CAR-Treg активировать эти клетки. Анти-CD3/CD28 гранулы удаляли через 5 дней после трансдукции, и трансдуцированные Treg оставляли в культуре на 2 дня в присутствии только IL-2, чтобы дать им возможность отдохнуть, таким образом избегая каких-либо остаточных признаков активации. Затем различные популяции CAR-Treg повторно стимулировали в присутствии только IL-2 (отрицательный контроль) или IL-2 в комбинации с анти-CD3/CD28 гранулами (положительный контроль) или SA Dynabeads®, покрытыми биотинилированным пептидом CV (CV-SA гранулами, фиг. 13).

В день 1 после повторной стимуляции оценивали наличие кластеров в лунках в качестве показателя взаимодействия между клетками и гранулами. Как показано на фиг. 14A, кластеры отсутствовали во всех лунках, независимо от специфичности трансдуцированного CAR, в условиях присутствия только IL-2 (без гранул). Как видно на фиг. 14A, в условиях анти-CD3/CD28 гранул кластеры наблюдали во всех популяциях Treg. В этом примере кластеры наблюдали только в лунках CV-CAR-Treg, когда клетки культивировали в присутствии CV-SA гранул, что может указывать на то, что CV-CAR специфически взаимодействуют с CV-SA гранулами.

Экспрессию маркеров активации, CD71 и CD25, на клеточной поверхности клеток оценивали на 3 день с помощью проточной цитометрии. В то время как в условиях присутствия только IL-2 клетки не экспрессировали CD71, а MFI для CD25 был низким, стимуляция анти-CD3/CD28 гранулами индуцировала экспрессию CD71 в подавляющем большинстве CAR-Treg (специфичных к CD19 и CV), а также обеспечивала сильное увеличение показателя MFI для CD25 (фиг. 14B). Индукцию экспрессии CD71 наблюдали в CV-CAR-Treg только в условиях CV-SA гранул. Процент CD71<sup>+</sup> клеток был ниже, чем процент, наблюдаемый с анти-CD3/CD28 гранулами, в частности среди CV.41BBz-CAR-Treg. Аналогично показатель MFI для CD25 был увеличен в условиях CV-SA гранул только у CV-CAR-Treg с немного более высоким значением MFI у CV.28z-CAR-Treg (фиг. 14C).

На фиг. 14A-14C показано, что только Treg, экспрессирующие CV-специфические CAR, проявляли признаки активации при стимуляции в присутствии CV-SA гранул.

Затем выполняли оценку, была ли стимуляция, опосредованная CV-специфическим CAR, индуцированная в присутствии CV-SA гранул, достаточной для запуска размножения клеток. Кратность увеличения различных популяций CAR-Treg во всех условиях измеряли на 5 день после повторной стимуляции (фиг. 14C). Полученные данные показали, что даже если кратность увеличения, индуцированная CV-SA гранулами, была ниже наблюдаемой в присутствии анти-CD3/CD28 гранул, CV-CAR-Treg-клетки эффективно пролиферировали после стимуляции, опосредованной CV-специфическим CAR. В соответствии с данными, показанными на фиг. 14B, размножение CV.41BBz-CAR-Treg, по-видимому, происходит менее эффективно, чем CV.28z-CAR-Treg, что наводит на предположение о возможной более мощной передаче сигналов CV.28z-CAR при активации клеток. Эти эксперименты также выполняли на клетках Tconv, и полученные результаты были аналогичными.

Кроме того, для подтверждения того, что активация, индуцированная с помощью CV-SA гранул, была обусловлена присутствием CV<sub>60-75</sub> пептидов также создавали аргинин-виментин<sub>60-75</sub> (ArgVim) пептид-SA гранулы и цитруллинированный-фибриноген бета-цепь<sub>36-52</sub> (CitFib) пептид-SA гранулы. При совместном культивировании CV-CAR-Treg с SA гранулами без покрытия, ArgVim-SA гранулами или CitFib-SA гранулами никаких признаков активации не наблюдали.

Пример 5. Оценка фенотипа и стабильности CV-CAR-Treg после размножения *in vitro*.

Фенотипический анализ и оценка продуцирования цитокинов в размноженных CV-CAR-Treg. В день 18 в конце второго раунда стимуляции фракцию различных популяций Treg подвергали поверхностному окрашиванию мечеными флуорохромом Ab, специфичными к CD4, CD25, CD127, EGFRt, и фиксируемым синим красителем LIVE/DEAD в течение 20 мин при 4°C. Параллельно другой образец клеток окрашивали CD4, CD127, EGFRt и фиксируемым синим красителем LIVE/DEAD с последующим внутрядерным окрашиванием FOXP3 и Helios с использованием набора буферов для окрашивания Foxp3 (eBioscience) в соответствии с инструкциями производителя. Для оценки продуцирования цитокинов клетки стимулировали PMA (100 нг/мл) и иономицином (1 мкг/мл) в течение 4 ч, и через 2 ч после начала инкубации добавляли брефельдин А (1×, Invitrogen). Затем клетки окрашивали фиксируемым синим красителем LIVE/DEAD и антителами к CD4, CD127 и EGFRt, фиксировали 1% параформальдегидом (PFA) в 1× PBS с 2% D-глюкозы, пермеабелизировали 0,1% сапонином в PBS с 5% FBS и окрашивали антителами, специфичными к IFN-γ, IL-2, IL-17 и IL-10. Клетки анализировали методом проточной

цитометрии (LSRII; BD Biosciences).

Для оценки фенотипической стабильности CV-CAR-Treg после двух раундов размножения в день 18 изучали профиль экспрессии основных поверхностных маркеров Treg (CD25, CD127) и факторов транскрипции (FOXP3 и Helios), а также продуцирование цитокинов. Нетрансдуцированные Treg и CV-CAR-Treg подвергали двум циклам стимуляции, где второй цикл активации выполняли либо анти-CD3/CD28 гранулами, либо CV-SA гранулами. В день 18 клетки оценивали с помощью проточной цитометрии на поверхностную экспрессию CD25 и CD127 (фиг. 15A) и внутриядерную экспрессию FOXP3 и Helios (фиг. 15B). Как показано на фиг. 17A и 15B, CV-CAR-Treg сохраняют свой Treg-фенотип после двух раундов стимуляции *in vitro*.

Для оценки профиля продуцирования цитокинов эти размноженные Treg стимулировали PMA/иономицином в течение 4 ч, последние 2 ч в присутствии брэфельдина А. Затем клетки фиксировали и окрашивали антителами, нацеленными на IFN-g, IL-2, IL-10 и IL-17 (фиг. 15C).

Три подмножества: нетрансдуцированные Treg, CV.28z-CAR-Treg и CV.41BBz-CAR-Treg сохраняли фенотип Treg (т.е. CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>, FOXP3<sup>+</sup>), как показано на фиг. 15A и 15B. Было замечено, что после размножения ни одна из Treg не экспрессировала IL-2 или воспалительные цитокины, INF-g и IL-17 (фиг. 15C). Никаких различий между нетрансдуцированными Treg и CV-CAR-Treg не наблюдали. Во втором раунде оценивали два условия повторной стимуляции: анти-CD3/CD28 гранулы или CV-SA гранулы. В обоих условиях получали аналогичные профили, что подтверждает концепцию того, что Treg сохраняют свой фенотип после опосредованной CV-CAR активации.

Пример 6. Разработка анализов *in vitro* для оценки терапевтического потенциала CV-CAR-Treg при РА.

Совместное культивирование CV-CAR-Treg с синовиальной жидкостью, полученной от пациента с РА. Образцы синовиальной жидкости (СЖ), полученные от пациентов с РА, предоставленные Джонатаном Графом, использовали для оценки способности CV-CAR-Treg активироваться через CAR с использованием более связанного с заболеванием источника цитруллинированного виментина. В день 9 после первого раунда стимуляции образцы синовиальной жидкости (свежие или размороженные) смешивали со средой для Т-клеток, дополненной IL-2 в соотношении 1:8, 1:16 или 1:32 (СЖ:клеточная среда). CAR-T-клетки высевали в 96-луночный планшет из расчета 50000 клеток на лунку, и в каждую лунку добавляли 200 мкл смеси СЖ и культуральной среды для Т-клеток. Через три дня клетки окрашивали антителами, специфичными к CD4, CD71, CD25 и фиксируемым синим красителем LIVE/DEAD, как описано ранее. Процент клеток, экспрессирующих CD71 и MFI CD25, получали с помощью проточной цитометрии путем отбора популяции LIVE CD4<sup>+</sup>.

Создание линии опухолевых клеток, экспрессирующих цитруллинированный виментин, и их характеристика. SKNBE2c представляет собой линию опухолевых клеток нейробластомы, которая, как известно, экспрессирует виментин на поверхности клеток. Клетки SKNBE2c (из ATCC) размораживали и культивировали в RPMI с глутамаксом, 10% FBS, HEPES и P/S. Используя метод сборки Гибсона (Gibson Assembly Master Mix, BioLabs), ген фермента пептидиларгининдезимидазы 2 (PAD2) человека вставляли в лентивирусный вектор pCDH-EF1-T2A-GFP (Addgene). Частицы вируса получали путем трансфекции клеток HEK 293T, а SKNBE2c трансдуцировали при MOI 1 частица на клетку. Эффективность трансфекции и трансдукции оценивали путем выявления экспрессии GFP с помощью проточной цитометрии. Для определения, запускает ли искусственная индукция экспрессии фермента PAD2, участвующего в процессе цитруллинирования, выработку цитруллинированного белка виментина в SKNBE2C, выполняли иммуофлуоресцентное окрашивание. Вкратце, как линии клеток SKNBE2C, трансдуцированных диким типом (WT), так и трансдуцированных PAD-GFP, высевали в 8-луночной камере из боросиликатного стекла (Lab-Tek). По достижении слияния клетки фиксировали 2% PFA в холодном 1× PBS в течение 30 мин, блокировали 2% BSA в 1× PBS в течение 30 мин при комнатной температуре, инкубировали в течение ночи с первичными антителами (химерными Ab BVCA1 с мышинным IgG2a, Ab к виментину или изотипическим контролем) при 4°C. Затем добавляли вторичные антитела на 1 ч при комнатной температуре в темноте, и клетки контрастировали, используя DAPI, в течение 10 мин. Клетки визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа (серия BZ-X700, Keyence). Результаты показаны на фиг. 20A и 20B.

Совместное культивирование CV-CAR-Treg с клеточными линиями PAD2-GFP SKNBE2C. Клетки WT и PAD2-GFP SKNBE2C высевали в 96-луночный планшет с плоским дном. После достижения слияния в лунку добавляли нетрансдуцированные Treg, CD19-CAR-Treg и CV-CAR-Treg в день 10 первого раунда их стимуляции в присутствии среды для Т-клеток, дополненной IL-2 в концентрации 300 ед/мл. После трех дней совместного культивирования клетки собирали и окрашивали антителами, специфичными к CD4, CD71 и CD25 и фиксируемым синим красителем LIVE/DEAD, как описано ранее. Процент клеток, экспрессирующих CD71 и MFI CD25, измеряли с помощью проточной цитометрии путем отбора популяции LIVE CD4<sup>+</sup>.

Для демонстрации способности CV-CAR-T-клеток активироваться с использованием источника цитруллинированного виментина, более связанного с заболеванием, использовали несколько подходов *in vitro*. Данные, полученные с использованием синовиальной жидкости, полученной от пациента с РА,

или линий опухолевых клеток, экспрессирующих CV, в качестве источника CV показали, что Treg, трансдуцированные CV.41BBz-CAR, не активировались в этих условиях, тогда как Treg, трансдуцированные CV.28z-CAR, были эффективно активированы. Это свидетельствует о том, что даже если обе конструкции CV-CAR запускают эффективный сигнал активации для CAR-экспрессирующей T-клетки в присутствии CV-SA гранул (искусственная презентация целевого антигена), только CV.28z-CAR активирует клетку в более физиологическом контексте.

Одним из подходов *in vitro* было совместное культивирование CV-CAR-Treg в присутствии синовиальной жидкости, взятой из сустава пациентов с РА, которые, как известно, обогащены нейтрофилами и внеклеточными ловушками нейтрофилов (NET), одним из основных источников цитруллинированного виментина при РА. Размноженные Treg, экспрессирующие различные конструкции CAR, а также нетрансдуцированные Treg, помещали в культуру в присутствии IL-2 с CV-SA гранулами или без них или синовиальной жидкостью, полученной от пациента с РА. Экспрессию CD71 оценивали с помощью проточной цитометрии через 3,5 дня культивирования (фиг. 16A). На фиг. 16B показан процент клеток CD71<sup>+</sup> среди фракций EGFRt<sup>+</sup> и EGFRt<sup>+</sup> в различных популяциях CAR-Treg.

Путем окрашивания клеток с помощью CD71 Ab через 3,5 дня совместного культивирования в присутствии синовиальной жидкости с РА было обнаружено, что только фракция EGFRt<sup>+</sup> CV.28z-CAR-Treg экспрессировала высокий процент маркера активации CD71 (фиг. 16A и 16B). На фиг. 16B представлена сводка данных, полученных с использованием СЖ от 4 различных пациентов с РА, согласно которым нетрансдуцированные Treg, CD19.28z-CAR-Treg и CD19.41BBz не показали никаких признаков активации в присутствии синовиальной жидкости. Этот эксперимент также выполняли с Tconv клетками, и были получены аналогичные результаты (данные не показаны). Были протестированы три образца синовиальной жидкости от разных пациентов с РА, и все они специфически индуцировали экспрессию CD71 в EGFRt<sup>+</sup> CV.28z-CAR-Treg (фиг. 18A) и Tconv (данные не показаны). Эти данные предполагают, что эта активация, опосредованная синовиальной жидкостью *in vitro*, зависит от CV-CAR. Важно отметить, что на 3,5 день на поверхности EGFRt<sup>+</sup> CV.41BBz-CAR индуцировалась только слабая экспрессия CD71 (фиг. 16B). Это наблюдение может быть связано с тем фактом, что сигнал, опосредованный CV.41BBz-CAR, имеет более низкую способность к активации клетки, чем сигнал, индуцированный CV.28z-CAR, как показано на фиг. 14A-14C.

Пример 7. Лечение человека с помощью CV-CAR-Treg при РА.

Возвращаясь к фиг. 1, создавали CV-CAR-Treg в соответствии с описанными методами, предназначенными для разработки клеточной терапии для пациентов с ревматоидным артритом. Этот терапевтический подход включает использование Treg самого пациента (аутологичных) путем выделения клеток из образца крови пациента. Выделенные Treg генетически модифицируют методами генной инженерии с использованием лентивирусного вектора, несущего трансген CV-CAR. CV-CAR-Treg подвергают двум раундам размножения *in vitro*, а затем вводят пациенту путем инфузии. Это может быть сделано в комбинации с лечением анти-TNF для оптимизации эффективности Treg в участках заболевания.

Соответственно в некоторых вариантах осуществления предоставляется способ лечения субъекта, у которого диагностирован ревматоидный артрит, включающий выделение T-лимфоцитов из биологического образца, полученного от субъекта, отделение регуляторных CD4<sup>+</sup> T-клеток (Treg) от обычных T-клеток (Tconv), причем Treg-клетки представляют собой CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, а Tconv представляют собой CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>, трансдукцию Treg-клеток вектором экспрессии, кодирующим химерный рецептор антигена (CAR), который специфически связывается с антигеном, цитруллинированным виментином (CV), стимуляцию анти-CD3/анти-CD28 гранулами трансдуцированных клеток Treg по меньшей мере один раз *ex vivo* для получения достаточного количества клеток Treg, специфичных к антигену CV, и повторную инфузию Treg субъекту, тем самым предоставляя лечение субъекту.

Пример 8. Поверхностная экспрессия CF-CAR.

В некоторых вариантах осуществления оценивали способность CV-специфичного CAR экспрессироваться на поверхности Treg, как показано на фиг. 17A и 17B, с использованием Ab к человеческому IgG (H+L). Это было сделано после лентивирусной трансдукции. Детектирование как CAR, так и рецептора эпидермального фактора роста (EGFRt) осуществляли с помощью проточной цитометрии. На фиг. 17A показана оценка экспрессии CAR и EGFRt на поверхности нетрансдуцированных Treg, CV/CD28z CAR<sup>+</sup> Treg и CV/41BBz CAR<sup>+</sup> Treg. На фиг. 17B показан процент CAR<sup>+</sup> клеток в различных экспериментах.

Пример 9. CV.28z-CAR-Treg активируются в присутствии синовиальной жидкости, полученной от пациентов с РА.

Для демонстрации способности Treg, экспрессирующих CV-CAR, распознавать и передавать сигналы в присутствии более клинически значимого источника цитруллинированного виментина, CV-CAR-Treg культивировали в присутствии синовиальной жидкости, взятой из сустава пациентов с РА, о которой известно, что она обогащена нейтрофилами и внеклеточными ловушками нейтрофилов (NET), одним из основных продуцентов CV при РА. Через 3 дня совместного культивирования с синовиальной жидкостью пациентов с РА или подагрой, последнюю использовали в качестве отрицательного контроля, анализировали экспрессию CD71 в Treg-клетках. В присутствии синовиальной жидкости, полученной от

пациента с подагрой, ни в одной из подгрупп Treg не наблюдали индукцию экспрессии CD71 (фиг. 18B). Однако при совместном культивировании с синовиальной жидкостью, полученной от пациентов с РА, CV.28z-CAR EGFR<sup>+</sup> Treg экспрессировали высокий процент маркера активации CD71, тогда как EGFR<sup>+</sup> Treg, присутствующие в той же лунке, или CD19.28z-CAR-Treg и CD19.41BBz-CAR-Treg не показали никаких признаков активации (фиг. 18B и 18C). В соответствии с этими данными цитруллинированный виментин был обнаружен в синовиальной жидкости пациентов с РА, но не в жидкости пациента с подагрой (фиг. 21).

Пример 10. CV.28z-CAR-Treg активируются в присутствии бесклеточной синовиальной жидкости, полученной от пациентов с РА.

Было описано, что цитруллинированный виментин в основном присутствует во внеклеточном матриксе воспаленного сустава, что позволяет предположить, что для того, чтобы CV.28z-CAR-Treg могли эффективно связываться со своим антигеном-мишенью, им не требуется межклеточное взаимодействие. Чтобы проверить эту гипотезу, сравнили профиль активации CV.28z-CAR-Treg после совместного культивирования в присутствии цельной синовиальной жидкости или бесклеточной синовиальной жидкости, полученной от пациентов с РА, используя верхний слой, полученный после центрифугирования в градиенте плотности. Полученные данные показали, что процент CV.28z-CAR-Treg, экспрессирующих CD71 в ответ на совместное культивирование с синовиальной жидкостью, полученной от пациентов с РА, в присутствии или отсутствии клеток в жидкости является аналогичным (фиг. 22A и 22B). Все эти данные являются убедительным доказательством концепции, согласно которой Treg, экспрессирующие CV.28z-CAR, способны связываться со своим антигеном-мишенью во внеклеточном матриксе, расположенном в воспаленном суставе пациентов с РА.

Пример 11. Супрессорная функция CV.28z-CAR-Treg-клеток после CAR-опосредованной стимуляции.

Для оценки супрессорной способности CV.28z-CAR-Treg-клеток после CAR-опосредованной стимуляции использовали технологию CRISPR/Cas9 для осуществления нокаута эндогенного TCR в Treg с целью создания TCR<sup>KO</sup> CV.28z-CAR<sup>+</sup> Treg (фиг. 23A и 23B). Анализ подавления выполняли с использованием эффекторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, стимулированных связанными с планшетом анти-CD3-антителами в качестве респондеров. Способность TCR<sup>KO</sup> CV.28z-CAR<sup>+</sup> Treg подавлять эти TCR-стимулированные Т-клетки-респондеры в присутствии CV-реп-СА гранул (CVb) (фиг. 24A и 24B) или гранул виментина (фиг. 24B) оценивали при различных соотношениях респондера к супрессорной клетке. Полученные данные показывают, что TCR<sup>KO</sup> CV.28z-CAR<sup>+</sup> Treg демонстрируют супрессорную активность после CAR-опосредованной стимуляции в присутствии CV-SA гранул, тогда как TCR<sup>KO</sup> CD19.28z-CAR<sup>+</sup> Treg не проявляют супрессорной активности в присутствии CV-SA гранул.

Пример 12. Материалы и методы.

Культивирование CV-CAR-Treg совместно с синовиальной жидкостью, полученной от пациента с РА. Образцы синовиальной жидкости (СЖ), полученные от пациентов с РА или пациента с подагрой, в качестве отрицательного контроля, предоставленные Джонатаном Графом, использовали для оценки способности CV-CAR-Treg активироваться через CAR с использованием более связанного с заболеванием источника цитруллинированного виментина. При получении достаточного количества образца синовиальной жидкости часть жидкости разбавляли 1× PBS и обрабатывали центрифугированием в градиенте плотности. Верхний слой (бесклеточный) собирали после центрифугирования и хранили при -80°. В день 9 после первого раунда стимуляции образцы цельной синовиальной жидкости и образцы бесклеточной синовиальной жидкости оттаивали и смешивали со средой для Т-клеток, дополненной IL-2 в различных соотношениях. CAR-Т-клетки высевали в 96-луночный планшет из расчета 50000 клеток на лунку, и в каждую лунку добавляли 200 мкл смеси СЖ и культуральной среды для Т-клеток. Через три дня клетки окрашивали антителами, специфичными к CD4, CD71, CD25 и фиксируемым синим красителем LIVE/DEAD, как описано ранее. Процент клеток, экспрессирующих CD71 и MFI CD25, получали с помощью проточной цитометрии путем отбора популяции LIVE CD4<sup>+</sup>.

Обнаружение присутствия цитруллинированного виментина в синовиальной жидкости прямым ELISA. 96-луночные планшеты для ELISA покрывали O/N при 4°C куриными антителами к виментину в концентрации 10 мкг/мл. Лунки промывали три раза и блокировали 200 мкл 1× PBS и 1% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре и снова промывали. Добавляли различные образцы супернатантов синовиальной жидкости, разведенные в PBS, 1% BSA, 0,1% Твин 20, и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. В некоторые другие лунки вместо синовиальной жидкости добавляли белок виментина и цитруллинированный белок виментина для использования в качестве отрицательного и положительного контролей соответственно. Лунки трижды промывали. Добавляли 100 мкл мышшиного химерного IgG BVCA1 (с мышшиными доменами CH2 и CH3) в концентрации 10 мкг/мл или изотипического контроля. Через 1 ч инкубации при комнатной температуре лунки промывали 3 раза и добавляли туда козы вторичные Ab к мышшиному IgG2a, конъюгированные с AP (Abcam, ab98695), при разведении 1/1000. Лунки промывали трижды и добавляли 100 мкл раствора субстрата Step pNPP. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 3 M NaOH через 45 мин, и оптическую плотность считывали на считывающем устройстве для микропланшетов при 405 нм.

Создание TCR-нокаутных клеток CV-CAR<sup>+</sup> Treg с помощью метода CRISPR/Cas9. Клетки Treg выделяли из свежих PBMC с помощью проточной цитометрии, как описано в примере 3, центрифугировали в течение 10 мин при 90 g и ресуспендировали в буфере для электропорации Lonza P3, используя 20 мкл буфера на 1 млн клеток. Затем Treg клетки подвергали электропорации с комплексами рибонуклеопротеинов CRISPR-Cas9 (RNP) с использованием 96-луночной системы для электропорации Lonza 4D с кодом импульса EH115. Сразу после электропорации в каждую лунку добавляли 80 мкл предварительно нагретой среды, и клетки оставляли в покое на 15 мин при 37°C. Затем Treg клетки стимулировали анти-CD3/CD28 гранулами в соотношении 1:1 в присутствии 300 мкл IL-2 на мл, как подробно описано в примере 3. Через два дня после сортировки и электропорации Treg клетки транедуцировали различными конструкциями CAR, как показано в примере 3. Через 7 дней клетки сортировали на основе экспрессии EGFRt и CD3 на TCR<sup>KO</sup>CAR<sup>+</sup> или TCR<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup> популяции. Затем клетки повторно стимулировали анти-CD3/CD28 гранулами в соотношении 1:1 в присутствии 300 мкл IL-2 на мл в течение 5-6 дней.

Анализ подавления с TCR<sup>KO</sup> CAR<sup>+</sup> Treg. Степень подавления Treg оценивали путем измерения пролиферации на основе включения [<sup>3</sup>H] тимидина. Через 12 дней размножения анти-CD3/CD28 гранулы удаляли из культур TCR<sup>KO</sup> CV.28z-CAR<sup>+</sup> Treg и TCR 19.28z-CAR Treg. Клетки оставляли в покое в течение 2 дней перед выполнением анализа на подавление. За день до анализа эффекторные CD4<sup>+</sup> Т-клетки (клетки-респондеры) оттаивали и хранили при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи в присутствии 30 мкл/мл IL-2. 96-луночные планшеты с круглым дном покрывали анти-CD3 антителом в концентрации 5 мг/мл в течение ночи и промывали 1× PBS. В день проведения анализа популяции TCR<sup>KO</sup> CAR<sup>+</sup> Treg и клетки-респондеры дважды промывали для удаления остаточного IL-2 из среды. Затем клетки помещали в лунки, покрытые анти-CD3 антителами по 50000 клеток-респондеров на лунку, и добавляли TCR<sup>KO</sup> CAR<sup>+</sup> Treg при различных соотношениях респондер:Treg (от 2:1 до 64:1) в присутствии виментин-SA гранул, CV-SA гранул, CD19 гранул или без гранул. Через 3 дня в каждую лунку добавляли 20 мкл [<sup>3</sup>H] тимидина (1 мКи). Через 16 ч пластины замораживали при -20°C. Планшеты собирали с помощью харвестера Packard FilterMate и подсчитывали число импульсов в минуту (CPM) в каждой лунке в сцинтиляторе Packard TopCount и счетчике люминесценции (Perkin Elmer, Waltham, MA). Для обоих анализов процент подавления рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ подавления} = 1 - \left[ \frac{\text{среднее значение CPM (Treg+респондер)}}{\text{среднее значение CPM (только респондер)}} \right] \times 100\%$$

Список последовательностей

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
1	<p>gttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaaccactgcttaagcctcaataaagctt  gacctgagtgtctcaagtagtgtgcccgtctgtgtgactctggaactagatccctcagaccctttt  agtcagtgtggaaaatctctagcagtgggcggccgaacagggactgaaagcgaagggaaccagagg  agctctctcgacgcaggactcggctgtgtaagcgcgcagggcaagaggcgaggggcgcgactgggt  gagtagcggcaaaatcttactagcggaggctagaaggagagatgggtcgagagcgtcagtattaa  gcgggggagaattagatcgggaaaaattcggftaaggccagggggaaagaaaaataataaataa  aacatatagtatgggcaagcaggagctagaacgattcgcagftaatcctggcctgttagaaacatcagaa  ggctgtagacaactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattat  aatacagtagcaaccctctattgtgtcatcaaaagatagagataaaagacaccaaggaaagcttagacaa  gatagagggaagagcaaaacaaagtaagaaaaagcacagcaagcagcagctgacacaggacacag  caatcaggtcagccaaaattccctatagtcagaacatccaggggcaaatggtacatcagccatc  ctagaactttaatgcatgggtaaaagttagaagagaaggcttcagcccagaagtataccatggttt  cagcattatcagaaggagccaccacaagatttaaacaccatgtaaacacagtggggggacatcaag  cagccatgcaaatgftaaagacacatcaatgaggaagctcaggcaagagaagagtgtgcagag  agaaaaagagcagtgaggaaataggagctttgtccttgggtcttgggagcagcaggaaagcactatgggc  gcagcgtcaatgacgctgagcgtacaggccagacaattattgtctgtatagtcagcagcagaacaatt  gctgagggctattgagcgcacagcatctgtcaactcagctctgggcatcaagcagctccaggca  agaatcctggctgtggaagatacctaaggatcaacagctcctgggattggggttctctggaaaact  catttgaccactgctgtgccttgatctacaatggcagtattcatccacaatttaaaagaaaagggggga  ttgggggtacagtcaggggaaagaatagacataatgcaacagacatacaactaaagaattaca  aaaacaaattacaanaattcaaaatttccgggttattacagggacagcagagatcagtttgggatcaatt  gcatgaagaatcgtcttagggtagcgttttgcgctccttcgagatctgcgacgctccgggtcccgt  cagtgaggcagagcgcacatcgcccacagtcctccgagaagttggggggaggggctggcaattgaaccg  gtgcttagagaaggtggcggggtaactgggaaagtgatgctgtactggctccgcttcttcccgag  gggtgggggagaaccgtatataagtgtagtgccgtgaaagcttctttcgaacgggttccggccag  aacacagctgaagcttcgaggggctcgcattctctcctcagcgcccggccctactgagccgccat  ccacgccggtgagtcgcttctccgctcccgcctgtggtgctcctgaactgcctccgcttaggt  aagtttaagctcaggtcgagaccggccttgcggcgctccctggagcctactagactacggcggc  tctccacgcttgcctgacctgctgtcaactctactgtcttctgttctgttctgctgcgcttacagatcc  aagctgtgaccggcgctacggctagcggccaccatgctgctgctgggtgaccagcctgctgctgctg  gagctgccccaccgcttctgctgatccccGAGGTGAAACTAATAGAATCTGGG  GGAGGCTTGTTGAGCCAGGGCGGTCTCTGAGACTCGCGTGATC  AACGTCTGGATCACCTTTGCCGACTACGGTTTGTCTGTTCCG  CCAGGGTCCCGCAAGGGCCTTGAATGGGTAGGTTTACTGGAC  CGAAACCTCGGTGAGACAACAGAATGCGCCCCGTCTGTGGA  AGACAGATGCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCACCGTCT  ATCTGCAGATGCACAGGCTCCAACACGAAGACACAGCCGTGTAC  TTCTGTGTTGGACCTTGGTTCGGCGACTTATTAATGTGGGGCCAG  GGAACCCTGGTCAACGTCTCCTCAGCTAGCTCCGGAGGCTCAAC  TTCTGGCTCCGGTAAGCCAGGCAGCGGAGAAGGTAGTAGTGGAT  CCGCGCGCGCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTG  CATCTGTTGGAGACAGAGTCTCCATCACTTGCCGGGCAACTCAG  GACATCAGCACATCTTAAAGCTGGTATCACAGAGACCCGGGAA  AGCCCCGAGGCTCCTGATCTATGGTGCTTCGAAGGTACAAACTG  GGGTCCCATCACGATTCAGCGGCAATGGGTCTGGCACAGAGTTC  ACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATAGGGACTTAT  TATTGTCTACAAGATGATGTTTCCCCTTACTGTTGGCCAGGGC</p>	<p>анти-CV  CAR-CD28z  вектор  экспрессии</p>

ACCAAGCTGGACATCAAACGCGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTA TCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTAT CCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCG GACCTTCTAAGCCCttctgggtgctggtggtgctggaggcgtgctggcctgctacagcctgc tggtcaccgtggccttcatcatcttttgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatg aacatgactccccccggccccaccgcaagcaatfaccagccctatgccccaccacgcgacttc gcagcctatcgtccccgggtgaagttcagcagaagcggcggaccccctgcctaccagcagggccagaa tcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaagggaagatgacgacgtcctggataagcggagggcc gggaccctgagatggcgcaagcctcggcggaagaacccccaggaaaggcctgtataacgaactgca gaaagacaagatggccgagcctacagcagatcggcatgaaggcgagcggaggcgggcaagg gccacgacggcctgtatcaggcctgtccaccgcccaaggatacctacgacggcctgcacatgcagg ccctgccccaaagctcagggcgcgaggagggcagagggaagtcttcaacatgcggtgacgtgga ggagaatcccggcctaggatgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcatt cctcctgatccacgcaaggtgtacggaataggtatggtgaafttaagactcactcctcataatgct acgaatataaacactcaaaaactgcacctccatcagtgccgatctccacatcctgccgtggcatttagg ggtgactcctcacatactcctcctgctgatccacaggaactggatattcgaaaaccgtaaggaatc acagggttttgcctgattcaggcctggcctgaaaacaggacggactccatgctttgagaaactgaaatc atagcggcaggaaccaagcaacatggcagtttctcttgcagctgcagcctgaacataacatcctggga ttacgctccctcaaggagataagtgatgagatgtgataattcaggaaacaaaatttgcctatgcaata caataaactgaaaaaactgttggacctccggcagaaaacaaaattataagcaacagaggtgaaaa cagctgcaagccacagggcaggtctgccctgtgctccccgaggcgtgctggggccccggagc ccagggactgctccttccggaatgacggcggcagggaaatgctggacaagtgcaacctctgg agggtgagccaaggaggttgggagaaactctgagtgacatacagtgccaccagagtgctcctcagg ccatgaacatcacctgcacagggcggacagacaactgtatccagtgtgccactacattgacggccc ccactgctgaagactgcccggcaggatcatgggagaaaacacacctggtctggaaatgacgag acggcggccatgtgtccacctgtgcatcacaactgcacctacggatgactggccaggtctgaaagg ctgtccaacgaatggcctaagatcccgtccatgccactgggatggggggccctccttctgctggtg tgggtggcctggggatcggcctctcatgtgagcggcctctagaccgggctgcaggaattcgatc aagcttatcgataatcaacctggtgattcaaaaatttggaaagattgactggtattcttaactatggtccttt tacgctatggtgatacgtgctttaatgcctttgatcatgctattgctccgctatggcttctatttctcctcct gtataaatcctggtgctgctctttatgaggaggttggcccgtgtcaggaacgtggcgtggtgctcact gtgttctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgctgctccttccgggactttcgctt tccccctcctattgcccagggcgaactatcgcgcctgcttcccctgctggacaggggctcggct gtgggcactgacaattcgtggtgttgcgggaaatcatgctccttctgctgctcgcctgtgttggca cctggattctgcggggagctcctctgctacgtccctcggccctcaatccagcggaccttcttcccgcg gctgctgcccggcctcctcggcctcttccgcctcttgccttgcctcagacgagtcggatctcctttggg ccgctccccgctacgataccgtcgaactagccgtaccttfaagcaaatgacttacaaggcagctgtagat cttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggctaattcactccaaaagagacaagatcgtct tttctgctgactgggtctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctgctactaactagggaacca ctgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgctcaaagtagtctgctcccgtctgttggactctgtaa ctagagatccctcagaccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagaattcgatataagcttatcgatacc gtcgacctgagggggggccccgtacccaattcgcctatagtgagctgattacaattcactggccgtc tttacaacgtcgtgactgggaaaacctggttaccacaacttaatcgccttgacgacatcccccttccg cagctggcctaatacgaaagagggcccgcaccgatcgccttcccaacagttgcaagcctgaatggcga atgaaaatgtaagcgttaattttgttaaaatcgcgttaaaatgtttaaatacagctcatttttaaccaatag gccgaaatcggcaaatccctataaatcaaaagaaatagaccgagatagggtgagtggttccagtttgg aacaagagtgcaactataaagaacgtggactccaactcaagggcgaaaaacgcttatcagggcgtat ggccactacgtgaacctaccctaataagttttggggcaggtgcccgtaaaagcactaaatcgaa ccctaaaggagccccgatttagactgacggggaagccggcgaacgtggcgagaagaaagg aagaaagcgaagagcggcgctagggcgctggcaagtgtagcggctcagctgcgctgtaaccacca caccgcccgttaatgcggcctacaggcgcgctcaggtggcacttttggggaaatgtcgcgggaa ccctattgttttctaaatacattcaaatgtatccgctcatgagacaataacctgataaatgcttcaa
---

	<p>taatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacattccgtgtcgccttattccctttttcggcattttgct  tctgtttttgctcaccagaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtg  gttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcccccgaagaacgtttccaatgat  gagcactttaaagtctgctatgtggcgcggattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggctg  ccgcatatactatttcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatctacggatggcat  gacagtaagagaattatgcaagtctgccataacctgagtgataaacctgcggccaacttactctgacaac  gatcggaggaccgaaggagtaaccgtttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgcctgatcgttg  ggaaaccggagctgaatgaagccatacaaacgacgagcgtgacaccacgatcctgtagcaatggcaa  caacgttgcgaacaactaactggcgaactacttactctgctcggcaacaattaatagactggatgg  aggcggataaaagtgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctgctgtttattgctgataaatctg  gagccgggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatgtaagccctccgatcgt  agttatctacacgacgggagtcaggcaactatggatgaaagaaatagacagatcgtgagataggtgcc  tactgattaaagcattgtaactgtcagaccaaattactatatactttagattgattaaaactcattttaa  ttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatccctaacgtgattttcgtccact  gagcgtcagaccctgtaaaaagatcaaaagatcttctgagatccttttttctgcgcgtaactcgtcgtt  caaacaaaaaacaccaccgctaccagcgggtgtttgttccggatcaagagctaccaactctttccgaag  gtaactggcttcagcagagcgcagataccaataactgttcttctagtgtaccgtatgtagccagtaaggccaactca  agaactctgtgacccgctacatacctcgtctgtaatcctgttaccagtgctgctgacgtggcgata  agtcgtgtcttaccgggtggactcaagacgatagtaccggataaggcgcagcggctgggctgacgg  gggggtcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacccgaactagatatacagcgtgagc  tatgagaaaagcggcactcccgaagggagaagggcgacaggtatccgtaagcggcagggctcgg  aacagggagcgcacgagggaagcttccaggggaaacgcctggtatcttatagtcctgtcgggttccgc  cacctctgactgagcgtcattttgtgatgctcgtcagggggcgagcctatgaaaaacggcagcaa  cggcggccttttaccggtcctgctgcttctgtcgcctttgtcacatgttcttctcgttatcccctgattctgt  ggataaccgtattaccgctttgagtgactgataaccgctcggcagccgaaccagccgagcagcga  gtcagtgagcgggaaagcggaaagcggccaatacgcacaaccgcctcctcccgcggtggccgattc  attaatgcagctggcagcagaggttcccactggaagcgggagtgagcgcgaacgcaattaatgtgag  ttagctcactattaggcaccccaagcctttacactttatgcttccgctctgtatgttgggaattgtgagcg  gataacaattcacacaggaacagctatgacatgattacgccaagctcgaaltaaccctactaaagg  gaacaaaagctggagctccaccgggtggcggcctcaggtcgagatccggctgaccagcaacatag  tcccgccctaactccccaatcccgccctaactcccccagttccccttctccgcccatggctga  ctaattttttattatgcagaggccgagggcgcctcggcctctgagctattccaagaagtgtgaggggctt  tttggagcctagccttttgcaaaaagccttcgacggtatcattggctcattgtccaacattaccgcatgtt  acattgattattgactagtattataatgaatcaattacggggtcattagttcatagcccatataggagtccgc  gttacataactacggtaaatggcccctggctgaccgccaacgacccccccattgacgtcaataat  gacgtatgtcccatagtaacccaataggacttccattgacgtcaatgggtggagatttacggtaaac  gcccactggcagatcatcaagtgtatcatatgccaagtacgcccctattgacgtcaatgacggtaaatgg  cccgcctggcattatgccagatcatgaccttatggactttctacttggcagatcatcagctattagctat  cgtattaccatggatgacgggtttggcagatcatcaatggcgtgggatagcgggttgactacggggattt  ccaagctccacccttggactcaatgggattgttttggcaccaaaatcaacgggacttccaaaatgct  gtaaacactccgccattgacgcaaatgggctgtagcgtgtacggaattcggagtggcgagccctca  gatcctgcatataagcagctgcttttgcctgtactgggtctctctg</p>	
<p>2</p>	<p>gttagaccagatctgagcctgggagctcctgcttaactagggaaccactgcttaagcctcaataaagctt  gccttgaagtgtcaagtagtgtgtgccctgtgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttt  agtcagtggtgaaaaatctcagcagtgcccccgaacaggactgaaagcgaagggaaccagagg  agctctctcagcagcagcagcctgctgaagcgcgacggcaagagcggggggcggcactggt  gagtagccaaaaattttagctagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagattaa  gcgggggagaattatgatgggaaaaaattcgttaaggccaggggaaagaaaaataataaata  aacatatagtatgggcaagcaggagctagaacgattcgagttatcctggcctgttgaaacatcagaa  ggctgtagacaaatactgggacagctacaacatccctcagacagatcagaagaacttagatcattata  aatacagtagcaaccctctattgtgtcatcaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaa  gatagagggaagcacaacaaaagtaaaaaagcacagcagcagctgacacaggacacag</p>	<p>анти-CV  CAR-41BBz  вектор  экспрессии</p>



<p>caatcaggctagcctaaattaccctatagtgacagaacatccaggggcaaatggtacatcagggccatcac  ctagactttaaagcatgggtaaaagtagtagaagagaaggctttcagcccagaagtataccatgtttt  cagcaftatcagaaggagccaccaccaagatttaaacacatgctaaacacagtgggggacatcaag  cagccatgcaaatgttaaagagacatcaatgaggaagctgcaaggcaaaagagaagtggtgacagag  agaaaaagagcagtggaataggagctttgtccttgggtcttgggagcagcaggaaactatgggc  gcagcgtcaatgacgctgacgggtacagggccagacaattattgtctgtatagtgacagcagacaattt  gctgagggctattgagggcaacagcatctgttgaactcacagctctgggcatcaagcagctccaggca  agaatcctggctgtgaaagatacctaaggatcaacagctcctgggatttggggttctctggaaaact  catttgcaccactgctgtgcttggatcaaatggcagttatccacaattttaaaagaaaagggggga  ttgggggtacagtgccaggggaaagaatagacataatgcaacagacatacaactaaagaattaca  aaaacaaattacaaaattcaaaatttccgggttattacagggacagcagagatcagtttgggatcaatt  gcatgaagaatctgttagggtaggcgttttgcgctgcttcgagagatctgcagctcctccggtgccgt  cagtgggcagagcgcacatcggccacagctcccagaaagtggggggaggggtcggcaattgaaccg  gtgctagagaaggtggcgggtaaaactgggaaagtgatgctgtgctagctcccttttcccgag  gggtgggggagaaccgtatataagtgacagtagtcgctgacgcttcttttgcacgggttggccgag  aacacagctgaagcttcgaggggctcgcactctccttcacgcgcccggccctactgaggccgcat  ccacccgggtgagtcgcttctcggcctcccggctgtgctcctcactgactcggcctcaggt  aagttaaagctcaggtcagaccggccttctcggcgtccttggagcctaactagactcagccggc  tctccacgttctcctgacccctgctgctcaactctacgtcttctgttctgttctgctgcccgttacagatcc  aagctgtgacggcgcctacggctagcggccaccatgctgctgctggtgaccagcctgctgctgctg  gagctgccccccccctttctgctgatcccGAGGTGAAACTAATAGAATCTGGG  GGAGGCTTGGTTGAGCCAGGCGGTCTCTGAGACTCGCGTGTAC  AACGTCTGGATTACCTTTGCCGACTACGGTTTGTCTGGTTCCG  CCAGGGTCCCGGCAAGGGCCTTGAATGGGTAGGTTTACTGGAC  CGAAACACCTCGGTGAGACAACAGAATGCGCCCCGTCTGTGGA  AGACAGATGCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCACCGTCT  ATCTGCAGATGCACAGGCTCCAACCGAAGACACAGCCGTGTAC  TTCTGTGTTGGACCTTGGTTCGGCGACTTATTAATGTGGGGCCAG  GGAACCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCTAGCTCCGGAGGCTCAAC  TTCTGGTCCGGTAAGCCAGGCAGCGGAGAAGGTAGTAGTGGAT  CCGCGCGGCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTG  CATCTGTTGGAGACAGAGTCTCCATCACTTGCCGGGCAACTCAG  GACATGACACATCTTAGGCTGGTATCACCAGAGACCCGGGAA  AGCCCCGAGGCTCCTGATCTATGGTGCTTCGAAGGTACAACTG  GGGTCCCATCACGATTCAGCGGCAATGGGTCTGGCACAGAGTTC  ACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATAGGGACTTAT  TATTGTCTACAAGATGATGGTTTCCCCTTCACTGTTGGCCAGGGC  ACCAACTGGACATCAAACGCGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTA  TCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTAT  CCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCG  GACCTTCTAAGCCCttctgggtgctggtggtggtcggaggcgtgctggcctgctacagcctgc  tggtcaccgtggccttcatcatctttgggtgaaacggggcagaaagaaactcctgtatattcaacaacc  atttatgagaccagtcaaaactactcaagaggaagatggctgtgctgccgattccagaagaagaagaa  ggaggatgtgaactgcgggtgaagttcagcagaagcggcggcctcctaccagcagggccaga  atcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaaagggaagagtagcagctcctggataagcggagaggc  cgggaccctgagatggcgcaagcctcggcggagaacccccaggaaggcctgtataacgaactgc  agaaagacaagatggccgagcctacagcagatcggcatgaaaggcagcggagggcgggcaag  ggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgcccaaggatactacgacccctgcacatgcag  ggcctgccccaaaggctcagggcggcgagagggcagaggaagtcttaacatgagggtgacgtgg  aggagaatcccggcctaggtcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcat  tcctcctgaccacgcaaagtgttaacggaataggtattggtgaattaaagactcactcctaataatgct  acgaatattaaacttcaaaaactgcacctccatcagtgccgatctccacatctgccggtggcatttagg</p>
--

ggtgactcctcacacatactcctcctggaatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaggaatc  
acagggttttctgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacccatgaccttggagaacctgaaatc  
atacggcgagaccagcaacatggcagtttctctgcatcgcagcctgaaacataccttggga  
ttacgctccctcaaggagataatgatgagatgataatcaggaacaaaatttggctatgcaata  
caataaaactggaaaaactgttggaccccggtcagaaaacaaaattataagcaacagaggtgaaaa  
cagctgcaaggccaagccaggtctgcatgcttctgctccccgaggctgctggggcccgagc  
ccagggactgctcttccggaatgtagccgaggcagggatgctgggacaagtgaaccttctgg  
agggtgagccaaggaggttgggagaactctgagtgatagcaccagagtgccctgctcagg  
ccatgaatcacctgacagaggggacagacaactgtatcagtgcccatcattgacggccc  
ccactgctcaagacctgcccggcagagtgatgggagaaaacacacccctggtcggaaatgacag  
acgcccggcctgctgccaactgctccatcacaactgcactacggatgcaactggccaggtctgaaagg  
ctgccaacgaatggcctaagatcccgtccatgcccactgggatggggggccctccttctgctgg  
tggggccctgggagatggcctctcatgtagcggcccttagaccggctgcaaggaaatcgatc  
aagctatcgataatcaacctggattcaaaaatttgaagagattgactggtattctaactatgtgctcctt  
tacgctatgggatacgtgctttaaactgcttcatgcttctccctgctgcttctcctcctcct  
gtataaatcctggtgctgctctttagaggatgtggcccgttgcaggcaactggcgtgctgctgact  
gtgttctgacgcaacccccactggtggggcattgcccaccctgctcagctccttccgggacttccgtt  
tccccctcctattgcccaggggaactatcgccgctgcttcccgtgctggacaggggctcggct  
gtgggactgacaattccgtggtgtgctggggaatcatgctccttccctgctgctcgtgctggtgcca  
cctggattctgctggcagctccttctgctacgctccttccggccctcaatccagcggacttctcccgcg  
gctgctgcccgtctgcccctcttccgctctcgccttccgctcagacgagtcggatctccttggg  
ccgctccccgctgataccgctgactagccgtactttaaagcaaatgactacaaggcagctgtagat  
cttagccacttttaaaagaaaaggggactggaaaggctaatcactccaaaagagaagatctgct  
tttgcctgactgggtctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctgctaaactagggaacca  
ctgcttaagcctcaataaagcttgcctgagcttcaagtagtgtgctcccctgttctgctgactctgtaa  
ctagagatccctcagaccctttagtcaagtggaaaatcttagcagaatcgatcaagcttatcgatacc  
gtgacctcgagggggggcccgtacccaattcgcctatagtagtctattacaattcactggcctcgtc  
tttacaactgctgactgggaaaaccctggcgttaccacaactaatgcttgcagcacatcccccttccg  
cagctggcgtaatagcgaagagcccgcaccgctcgccttcccaacagttgcgagcctgaatggcga  
atggaattgtaagcgttaataattttgtaaaatcgcgttaaattttggtaaatcagctatttttaaccaatg  
gcccgaatcggcaaaatccctataaatcaaaagatagaccgagataggggtgagttgttccagtttgg  
aacaagagtcactatfaaagaactgagactccaactcaaaaggcgaaaaaccgcttatcagggcgat  
ggcccactacgtgaacctaccccaatcaagtttttggggctgaggtgcccgtaaaactaaatcgaa  
ccctaaaggagccccgatttagagcttgacgggaaagcccggcgaactggcgaagaagggaagg  
aagaagcgaaggagcgggctgaggcctggcaggtgtagcggctcacgctcgcgtaaccacca  
cacccggcgcctaatgcccgcctacagggcgcgtcaggtggcacttttccgggaaatgtcgcggaa  
cccctattgtttatttctaatacattcaaatatgatcgcctcatgagacaataacctgataaatgcttcaa  
taattattgaaaaaggagatgatgattcaacatttccgtcgccttattcccttttggcgcatttgcct  
tctgttttctcaccagaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtg  
gttacatcgaactgactcaacaagcgtgaaatccttagagtttcccccgaagacgttttcaatgat  
gagcactttaaagtctgctatgtggcgggtattatccgtattgacggcgaagagcaactcggctc  
ccgatacactattcagaatgacttgggtgagtagtaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcat  
gacagtaagagaattatgcagtgctgccaataacatgagtagaacactcggccaacttactctgacaac  
gatcggagcgaaggagcctaaccgtttttgcacaactgggggatcatgtaactgccttgcctggtg  
ggaaaccggagctgaaatgaaaccataccaacgacgagctgacaccacgatgctgtagcaatggcaa  
caacgttgcgcaactatfaactggcgaacttactctagcttcccggcaacaataatgactggatgg  
aggcgataaaagtgcaggaccacttctgctcggccctccggctgctgtttattgctgataaatctg  
gagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgagcactggggccagatgtaagccctcccgtatcgt  
agttatctacacgacgggagtcaggcaactatggatgaaatagacagatcgtgagataggtgcc  
tactgattaagcattgtaactgtagaccaaagttaactatatactttagattgatttaaaactcattttaa  
tttaaaagatctaggtgaaagatccttttgaataatctcatgacaaaatccctaacgtgagtttctgctccact  
gagcgtcagaccctgtagaaaatcaaaaggatcttctgagatccttttctgctgtaactcgtcgtg

	<p>caaacaaaaaacaccgctaccagcgggtggtttgttccggatcaagagctaccaactctttccgaag          gtaactggctcagcagagccagataccataactgttcttagttagccagcttagccaccactca          agaactctgtagccagccatatacctcgtctgtaactctgttaccagtggtgctgccagtgccgata          agtctgtcttaccgggtggactcaagacgatagttaccgataaggcgcagcggctgggctgaacgg          ggggttcgtgacacagcccagcttgagcgaacacctacaccgaactgagatacctacagctgagc          tatgagaaagccacgcttcccgaaggagaaaaggcgacaggtatccgtaagcggcagggctgg          aacagagagcgcacaggggagcttccaggggaaacgcctgtatctttagtctgtcgggttcgc          cacctctgactgagcgtcattttgtgatgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaacgccagca          cggcggcctttacggcttccgctttgtgctcctttgtcacaatgtcttctgctgttatcccctgattctgt          ggataaccgtattaccctttgagtgagctgataccgctcggcgaaccgaacgaccgagcgcagcga          gtcagtgagcgggaaagcggagcgcaccaatagcaaacccctctcccgcgcttgccgattc          attaatgacgctggcacgacaggttcccactggaaagcggcagtgagcgaacgcaataatgtgag          ttactcactattaggcaccagcctttactttatgcttccggctcgtatgttgggaattgtgagc          gataacaattcacacaggaacagctatgacatgattacccaagctcgaattaaccctcactaaagg          gaacaaaagctggagctccaccgctggcggcctcaggtcagatccggcaccgcaaccatag          tcccggcctaactcccactcccggcctaactcccgaagtccgccaattctcccggcctggctga          ctaattttttattatgacagagccgagccctcggcctctgagctattccaagaagtggaggcctt          tttggaggcctaggctttgcaaaaagcttcgacggatcattggctcatgtccaacattaccgcatgtg          acattgatttagctagtattataatgtaataatcagggctcattgctcatagcccatataggagttccgc          gttacataactacgtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgccattgacgtcaataat          gacgtatgtcccatagtaacgcaataggacttccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaact          gcccaactggcagtagatcaatgtagatgcaagtagcggccttattgacgtcaatgacggtaaatgg          cccgctggcattatcccagtagatgacattgggacttctactggcagtagatctacgtattagtc          cgtattaccatggtgatcgggtttggcagtagatcaatggcgtggatagcgggttactcaggggatt          ccaagctccaccattgacgtcaatgggagttgtttggcaccaaaacacgggacttccaaaatgtc          gtaaacactcccattgacgcaaatggcggtgagcgtgacggaaatcgagtgccgagcctca          gatcctgcatataagcagctgctttgtcctgactgggtcctctg</p>	
3	<p>VYATRSSAVRLRSSVP</p>	<p>пептид 60-75 человеческого ВИМЕНТИНА</p>
4	<p>AYVTRSSAVRLRSSVP</p>	<p>пептид 60-75 мышинного ВИМЕНТИНА</p>
5	<p>gaggtgaaactaataagaatctggggagcctgggtgagccaggcggctctgagactcgcgtgtaca          cgtctggaltcactttgccactacggtttgtcctgggtccgccagggtcccggcaaggccttgaatggg          taggtttcactggaccgaaacacctcggtagacaacaagaatgcgccctctgtggaagacagatgac          catctcaagagatattcaaaagcaccgtctatctgagatgacagcctccaacacgaagacagacc          gtgacttctgttggacctgggtcggcacttattaatgtggggccagggaaccctgtaccgtctcct          cagctagctccggaggctcaacttctggctccggttaagccaggcagcggagaaggtagtagtggatccg          cgcgcgccatccagatgaccagctcctcctcctgctgcatctgtggagacagagttccatcact          gccgggcaactcaggacatcagcacatctttaggctggtatcaccagagaccgggaaagccccgagg          ctctgatctatggtgcttcaaggtacaactgggtcccatcaggtcagcggcaatgggtctggcac          agagttcactctaccatcagcagcctgagcctgaagatattaggacttattgtctacaagatgaggt          ttccgttcaactgttggcaggcaccacgaactggacatcaaacgcggcggcaattgaaattatgatcct          cctccttaccatgacaatgagaagagcaatggaaaccattatccatgtgaaagggaacacctttgccaagt          cccctattcccggaccttaagcccttctgggtgctggtggtggtcggaggcgtgctggcctgctacagc          ctgctgtcaccgtggcctcatctttgggtgaggagtaagaggagcaggtcctctgcacagtacta          catgaaatgactccccgcccccgggcccccgaagcattaccagcctatgccccaccagcgc          acttcgcagcctatcgtcccgggtgaagttcagcagaagcggcagcggcctgctaccagcaggcc          agaatcagctgtacaacgagctgaacctggcagaaagggaagtagcagctcctgataagcggaga          ggccggaccctgagatggcggcaagcctcggcggaaacccccgaaggcctgtataacgaac          tgcagaaagacaagatggccgagcctacagcagatcggcatgaaggcggagcggaggcgggca</p>	<p>анти-CV CAR-CD28z, нуклеотид</p>

	agggccacgacgcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgcctgcacatgc aggccctgcccccaagg	
6	gaggtgaaactaatagaatctggggaggctgttgaggccaggcggctctctgagactcgcgtgtaca cgtctggattcacctttgccactacggtttgtcctggtccgccagggtcccggcaaggcctgaaatggg taggtttcactggaccgaaacacctcgggtgagacaacaagaatcgccccgtctgtggaagacagatgcac aatctcaagagatgattcacaagcaccgtctatctcagatgcacaggctccaacacgaagacacagcc gtgtactctgtgtggacctgtgtcggcgacttataatgtggggccagggaacctgtaccgtctct cagctagctccggagctcaactctgctccggtaaagccaggcaggagaaggtagtagtgatccg cgcgcgccatccagatgaccagtctccatcctcctctgtctcatctgttgagacagagtctccatcact gcccggcaactcagacatcagacacatctttaggtgtgtatcaccagagaccgggaaagccccgagg ctcctgatctatggtgctcgaaggtaaaaactgggggtcccatcagcattcagcggcaatgggtctggc agagttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatatagggaacttattgtctacaagatgatgt ttcccgctcactgttggccaggcaccagctggacatcaaacgcccggccgaattgaagttagtctct cctcttaccagcaatgagaagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaacccttctccaagt cccctatttcccggactcttaagccctctgggtgctgtgtggtgctggagcgtgctggcctgctacagc ctgctggtcaccgtggcctctcatcttttgggtgaaacggggcagaagaactcctgtatatattcaaac aacattttatgagaccagtacaaactactcaagaggaaagatggctgtagctgccgattccagaagaaga gaaggaggatgtgaactcgggtgaaattcagcagaagcggcagcgcctctaccagcaggcc agaatcagctgtacaacgagctgaactgggcagaaagggaagatcagcgtcctggataagcggaga ggccgggaccctgagatggcgcaagcctcggcggaaagacccccgaaggcctgtataacgaac tgcagaaagacaagatggccgagcctacagcagatcgatgaaggcgcagcggagcggggca aggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacccctgcacatgc aggccctgcccccaagg	анти-CV CAR-41BBz, нуклеотид
7	gaggtgaaactaatagaatctggggaggctgttgaggccaggcggctctctgagactcgcgtgtaca cgtctggattcacctttgccactacggtttgtcctggtccgccagggtcccggcaaggcctgaaatggg taggtttcactggaccgaaacacctcgggtgagacaacaagaatcgccccgtctgtggaagacagatgcac aatctcaagagatgattcacaagcaccgtctatctcagatgcacaggctccaacacgaagacacagcc gtgtactctgtgtggacctgtgtcggcgacttataatgtggggccagggaacctgtaccgtctct cagctagctccggagctcaactctgctccggtaaagccaggcaggagaaggtagtagtgatccg cgcgcgccatccagatgaccagtctccatcctcctctgtctcatctgttgagacagagtctccatcact gcccggcaactcagacatcagcacatctttaggtgtgtatcaccagagaccgggaaagccccgagg ctcctgatctatggtgctcgaaggtaaaaactgggggtcccatcagatcagcggcaatgggtctggc agagttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatatagggaacttattgtctacaagatgatgt ttcccgctcactgttggccaggcaccagctggacatcaaacgcccggcggca	анти-CV scFv, нуклеотид
8	attgaagttagtattcctcctccttagacaatgagaagcaatggaaccattatccatgtgaaaggga aacaccttggcccaagtccttatttcccggaccttctaagccc	hCD28 спейсер, нуклеотид
9	ttctgggtgctggtggtgctggaggcgtgctggcctgctacagcctgctggtcaccgtggccttcatc tttgggtg	CD28 ТМ домен, нуклеотид
10	cggtgaaagttagcagaagcggcagcccctgctaccagcaggccagaatcagctgtacaacga gctgaacctggcagaagggaagtagtacgctcctggataagcggagaggccgggaccctgagatg ggcggcaagcctcggcgaagaacccccaggaagcctgtataacgaactgcagaagacaaagatgg ccgagcctaagcagatcgcatgaaggcggcggagcgggcaaggccacgacggcctgt atcagggcctgtccaccgcccaaggatacctacgacggcctgcacatgcaaggcctgcccccaagg	CD3ζ внутриклеточ ный домен, нуклеотид
11	aggagtaagaggagcaggctcctgcacagtactacatgaacatgactccccggccccggccac ccgcaagcattaccagcctatgccccaccgcgacttcgagcctatcgctcc	CD28 внутриклеточ ный домен, нуклеотид
12	aaacggggcagaagaactcctgtatattcaacaaccatttagagaccagtaaaactactcaaga ggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaaggaggatgtgaactg	41BB внутриклеточ ный домен,

		нуклеотид
13	EVKLIESGGGLVEPGRSLRLACTTSGFTFADYGLSWFRQPGKGLE WVGF TGPKHLGETTECAPSVEDRCTISRDDSKSTVYLQMHRLQHE DTAVYFCVGPWFGDLLMWGQGLVTVSSASSGGSTSGSGKPGSGE GSSGSARAIQMTQSPSSLSASVGDVRSITCRATQDISTSLGWYHQR GKAPRLLIYGASKVQTGVPSRFSGNGSGTEFTLTISLQPEDIGTY CLQDDGFPFTVGGTKLDIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHV KGKHLCPSPFLFPGPSKPFVWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRS KRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR	анти-CV CAR-CD28z, аминокислота
14	EVKLIESGGGLVEPGRSLRLACTTSGFTFADYGLSWFRQPGKGLE WVGF TGPKHLGETTECAPSVEDRCTISRDDSKSTVYLQMHRLQHE DTAVYFCVGPWFGDLLMWGQGLVTVSSASSGGSTSGSGKPGSGE GSSGSARAIQMTQSPSSLSASVGDVRSITCRATQDISTSLGWYHQR GKAPRLLIYGASKVQTGVPSRFSGNGSGTEFTLTISLQPEDIGTY CLQDDGFPFTVGGTKLDIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHV KGKHLCPSPFLFPGPSKPFVWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVCR GRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR	анти-CV CAR-41BBz, аминокислота
15	EVKLIESGGGLVEPGRSLRLACTTSGFTFADYGLSWFRQPGKGLE WVGF TGPKHLGETTECAPSVEDRCTISRDDSKSTVYLQMHRLQHE DTAVYFCVGPWFGDLLMWGQGLVTVSSASSGGSTSGSGKPGSGE GSSGSARAIQMTQSPSSLSASVGDVRSITCRATQDISTSLGWYHQR GKAPRLLIYGASKVQTGVPSRFSGNGSGTEFTLTISLQPEDIGTY CLQDDGFPFTVGGTKLDIKRAAA	анти-CV scFv, аминокислота
16	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSK	hCD28 спейсер, аминокислота
17	FWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 TM домен, аминокислота
18	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHG LYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CD3ζ внутриклеточ ный домен, аминокислота
19	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 внутриклеточ ный домен, аминокислота
20	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCEL	41BB внутриклеточ ный домен, аминокислота
21	ValTyrAlaThrCitSerSerAlaValCitLeuCitSerSerValPro Cit=citrulline	Пептид человеческого CV 60-75
22	AlaTyrValThrCitSerSerAlaValCitLeuCitSerSerValPro Cit=citrulline	Пептид 60-75 мышинного CV

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный рецептор антигена (CAR), содержащий антигенспецифический связывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен CD3ζ, причем антигенспецифический связывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) и специфически связывается с антигенами, содержащими полипептиды цитруллинированного ви-мента (CV) или его пептиды, имеющие по меньшей мере 95% идентичности SEQ ID NO: 21 или 22, где костимулирующий домен содержит полипептид CD28 или 41BB.

2. Химерный рецептор антигена по п.1, где

а) шарнирный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8;

б) трансмембранный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9;

в) сигнальный домен CD3ζ кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или

d) костимулирующий домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

3. Химерный рецептор антигена по п.1, где

a) шарнирный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 8;

b) трансмембранный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9;

c) сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 10; и/или

d) костимулирующий домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 11.

4. Химерный рецептор антигена по п.1, где

a) шарнирный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8;

b) трансмембранный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9;

c) сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или

d) костимулирующий домен 41BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

5. Химерный рецептор антигена по п.1, где

a) шарнирный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 8;

b) трансмембранный домен кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9;

c) сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 10; и/или

d) костимулирующий домен 41BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 12.

6. Химерный рецептор антигена по любому из пп.1-5, где CV-CAR специфически связывается с пептидом CV, содержащим последовательности с SEQ ID NO: 21 или 22.

7. Выделенная Т-клетка, которая модифицирована для экспрессии химерного рецептора антигена (CAR), содержащего антигенсвязывающий домен, связанный по меньшей мере с одним костимулирующим доменом и сигнальным доменом CD3 $\zeta$ , где костимулирующий домен содержит полипептид CD28 или 41BB и где антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который специфически связывается с цитруллинированным виментином (CV), имеющим по меньшей мере 95% идентичности SEQ ID NO: 21 или 22.

8. Выделенная Т-клетка по п.7, где

a) CAR содержит шарнирный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8;

b) CAR содержит трансмембранный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9;

c) сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или

d) костимулирующий домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

9. Выделенная Т-клетка по п.7, где

a) CAR содержит шарнирный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 8;

b) CAR содержит трансмембранный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9;

c) сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 10; и/или

d) костимулирующий домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 11.

10. Выделенная Т-клетка по п.7, где

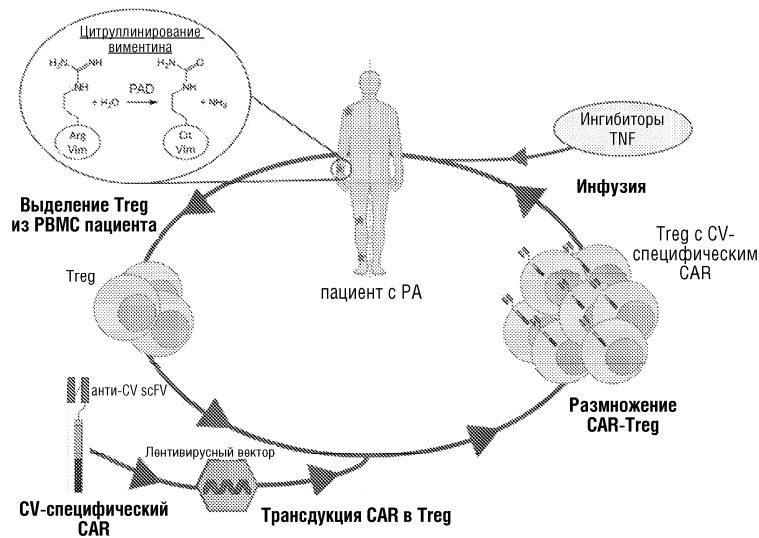
a) CAR содержит шарнирный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8;

b) CAR содержит трансмембранный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9;

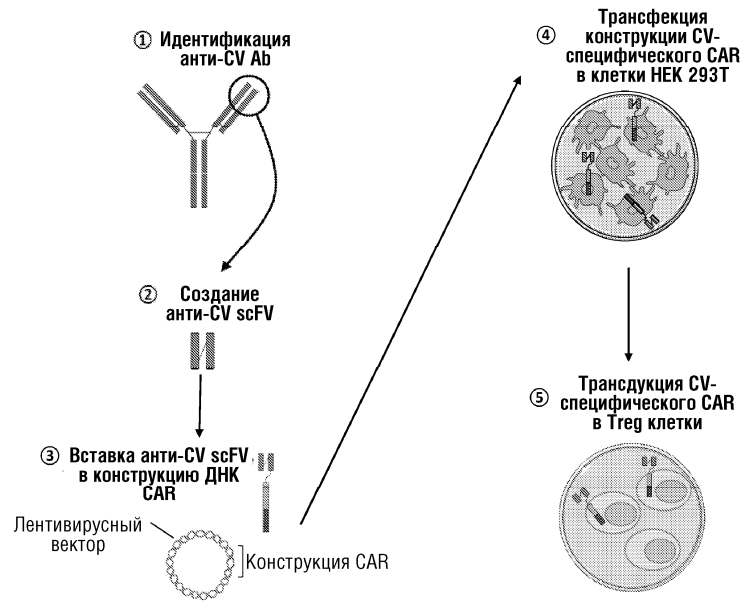
c) сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10; и/или

d) костимулирующий домен 41BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

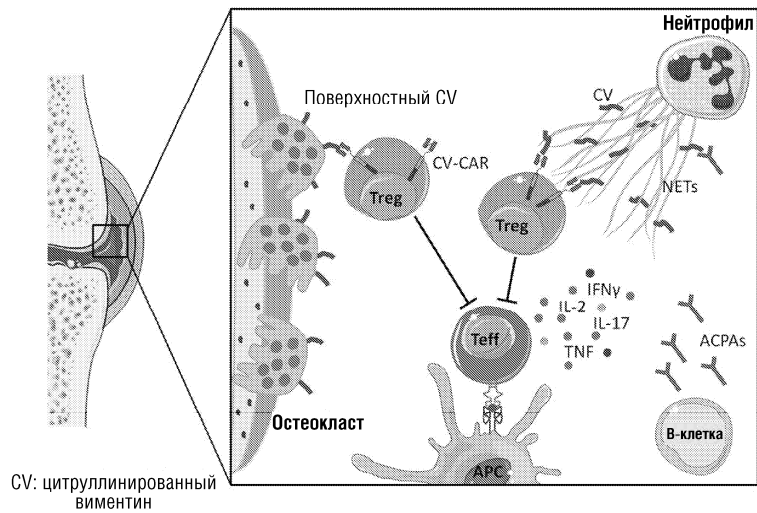
11. Выделенная Т-клетка по п.7, где
- CAR содержит шарнирный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 8;
  - CAR содержит трансмембранный домен, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9;
  - сигнальный домен CD3 $\zeta$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 10; и/или
  - костимулирующий домен 41BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 12.
12. Выделенная Т-клетка по любому из пп.7-11, где Т-клетка представляет собой регуляторную Т-клетку (Treg) млекопитающего.
13. Выделенная Т-клетка по п.11, где Treg клетка является CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup>.
14. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный рецептор антигена (CAR) по любому из пп.1-6.
15. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.14.
16. Химерный рецептор антигена (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен CD3 $\zeta$ , причем антигенспецифический домен содержит антитело или фрагмент антитела, где фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывается с антигенами, содержащими полипептиды цитруллинированного виментина (CV) или его пептиды, имеющие по меньшей мере 95% идентичности SEQ ID NO: 21 или 22.
17. Химерный рецептор антигена по п.16, где костимулирующий домен содержит полипептид CD28 или 41BB.
18. Фармацевтическая композиция, содержащая химерный рецептор антигена (CAR) по любому из пп.1-6, 16 и 17 или выделенную Т-клетку по любому из пп.7-13.
19. Химерный рецептор антигена по любому из пп.1, 16 и 17 или выделенная Т-клетка по любому из пп.7-13, где указанный scFv имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.



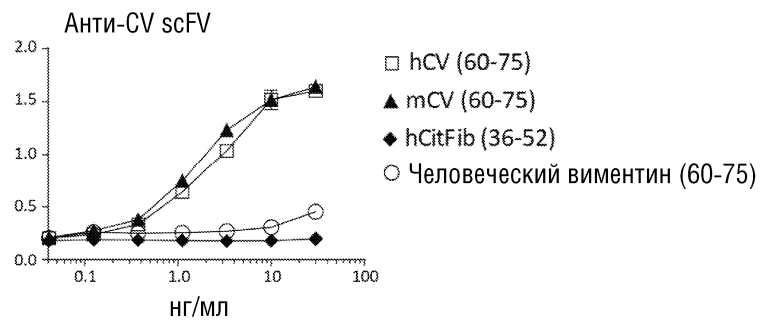
Фиг. 1



Фиг. 2

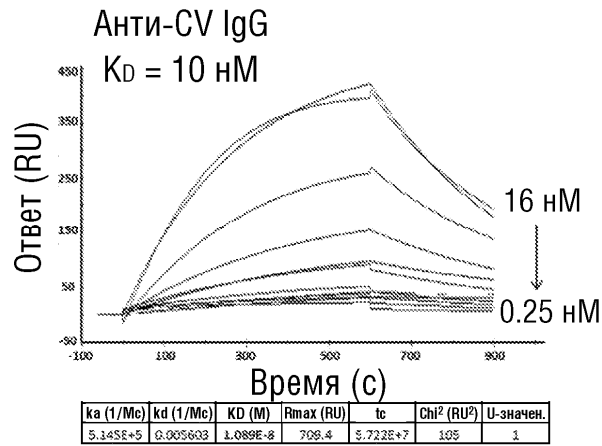


Фиг. 3

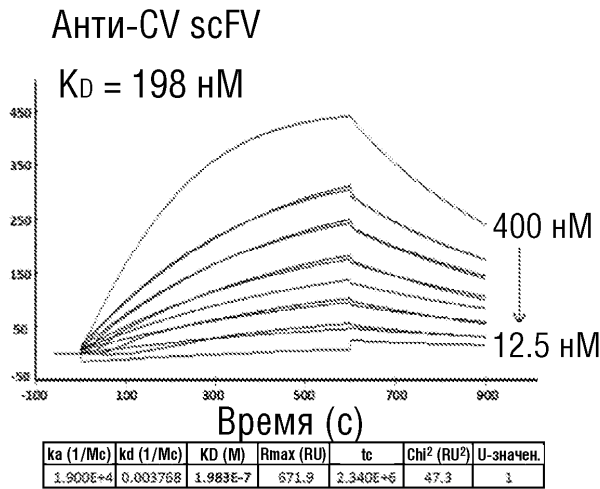


Фиг. 4





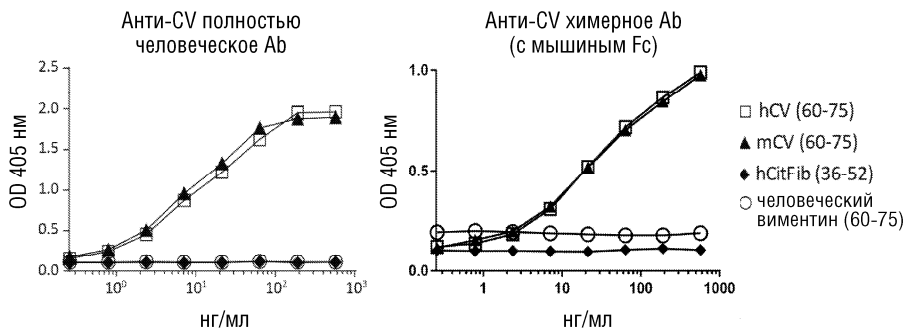
Фиг. 5А



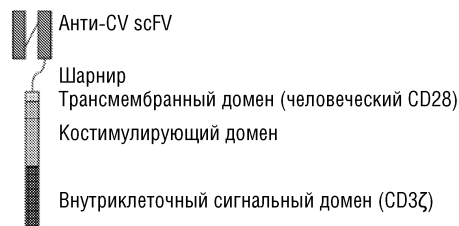
Фиг. 5В

человеческий виментин (60-75)	VYATR <del>SS</del> AVRLR <del>SS</del> V
мышинный виментин (60-75)	AYVTR <del>SS</del> AVRLR <del>SS</del> V

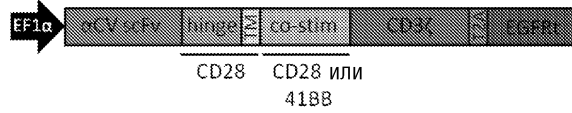
Фиг. 6



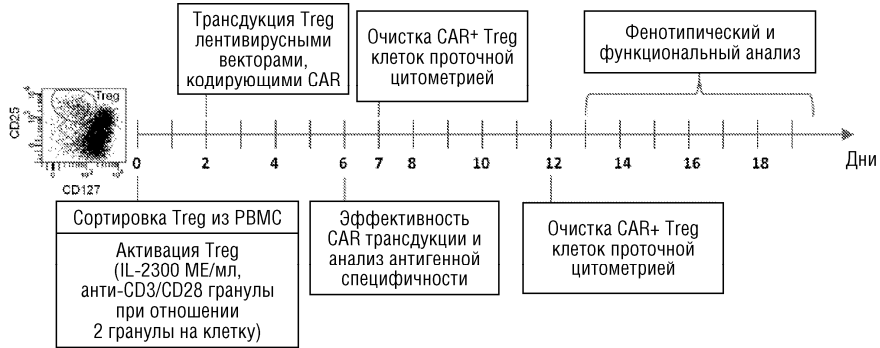
Фиг. 7



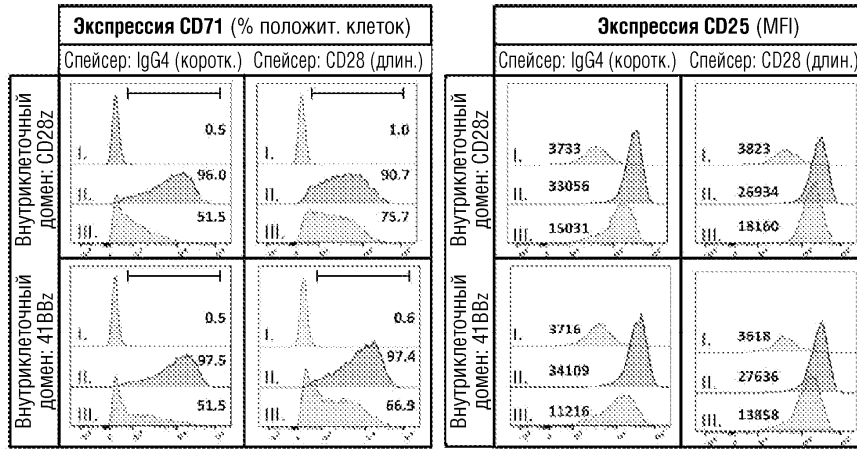
Фиг. 8А



Фиг. 8В

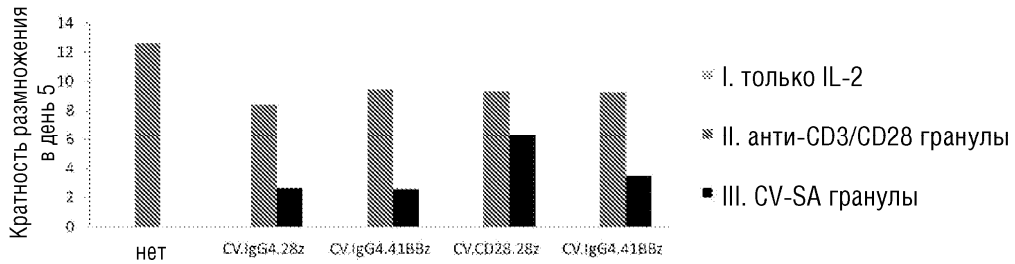


Фиг. 9

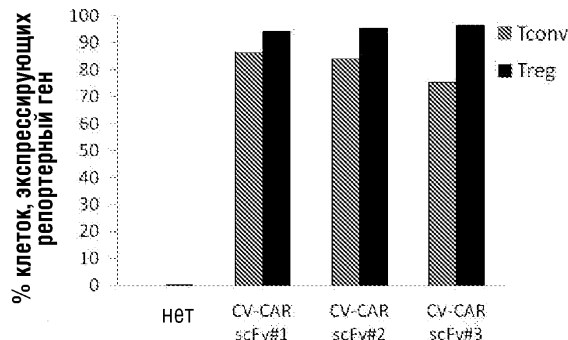


I. только IL-2    II. анти-CD3/CD28 гранулы    III. CV-SA гранулы

Фиг. 10А

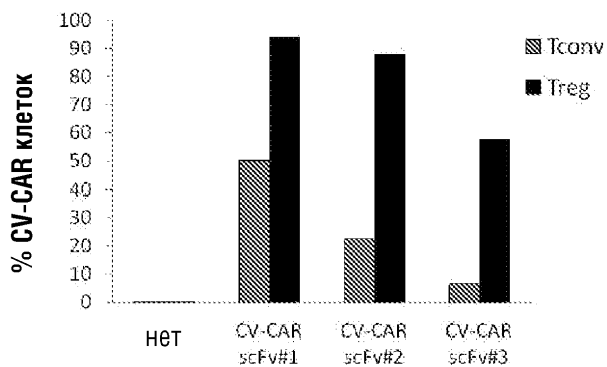


Фиг. 10В

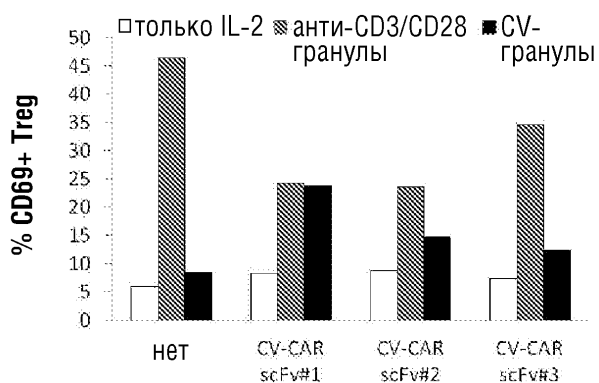


Фиг. 11А

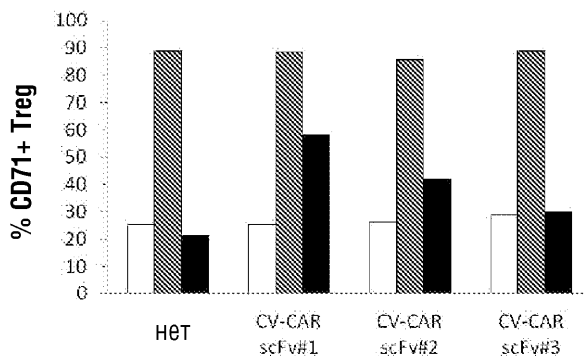
046731



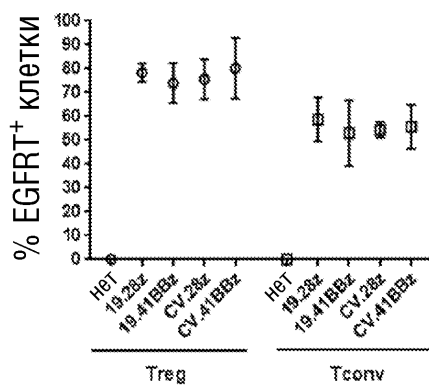
Фиг. 11В



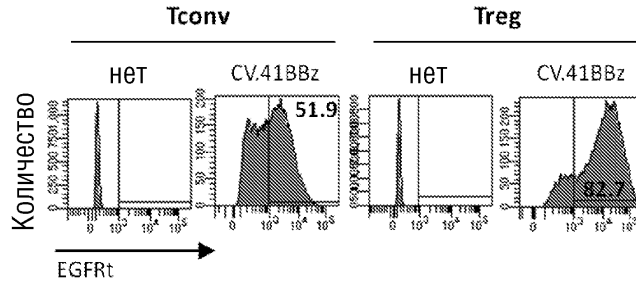
Фиг. 11С



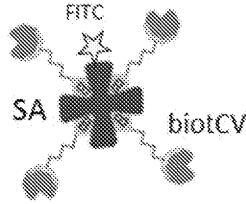
Фиг. 11D



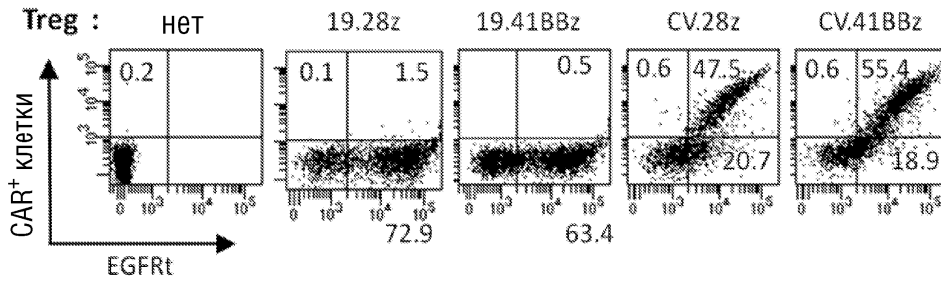
Фиг. 12А



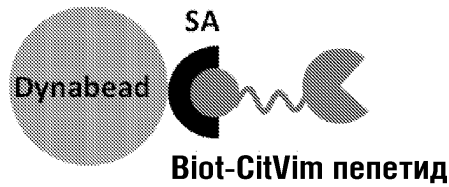
Фиг. 12В



Фиг. 12С



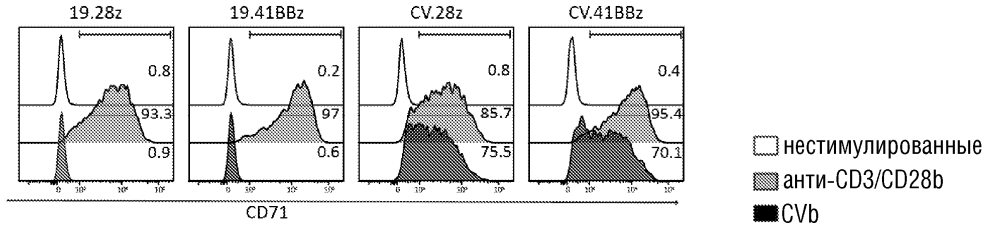
Фиг. 12D



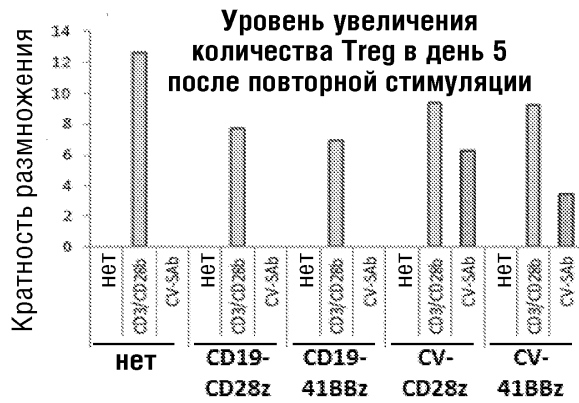
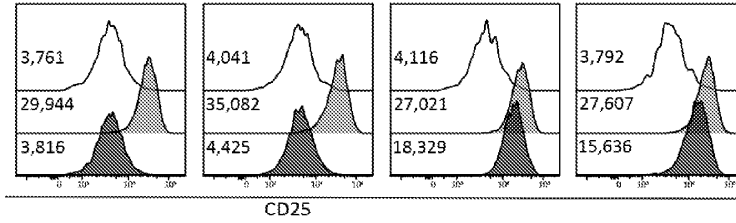
Фиг. 13

		Без гранул	CD3/CD28 гранулы	CV-SA гранулы
CD19-специфич. CAR+ Treg	Костим. домен CD28			
	Костим. домен 41BB			
CV-специфич. CAR+ Treg	Костим. домен CD28			
	Костим. домен 41BB			

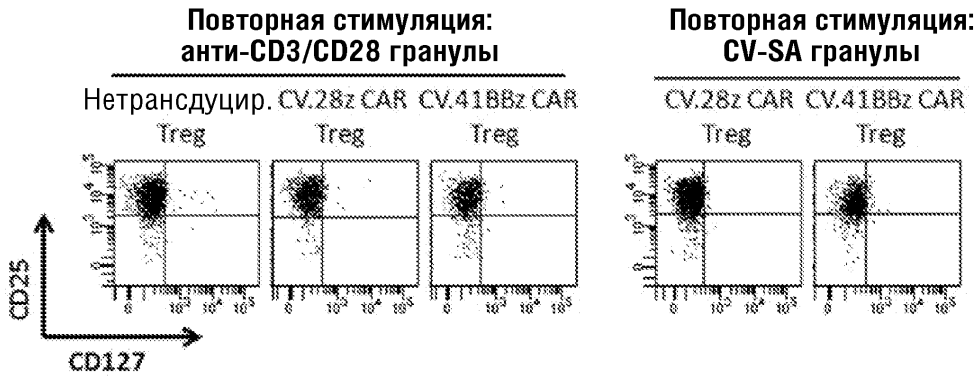
Фиг. 14А



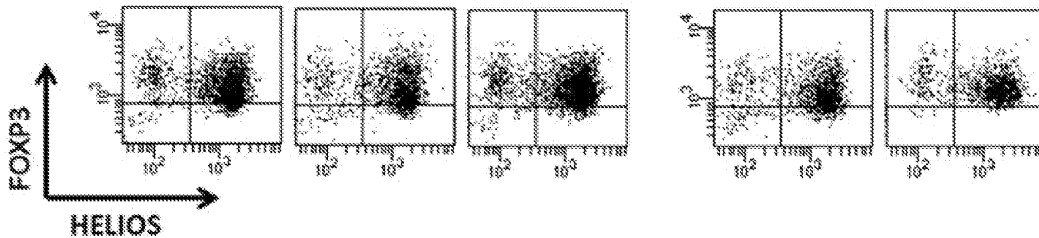
Фиг. 14В



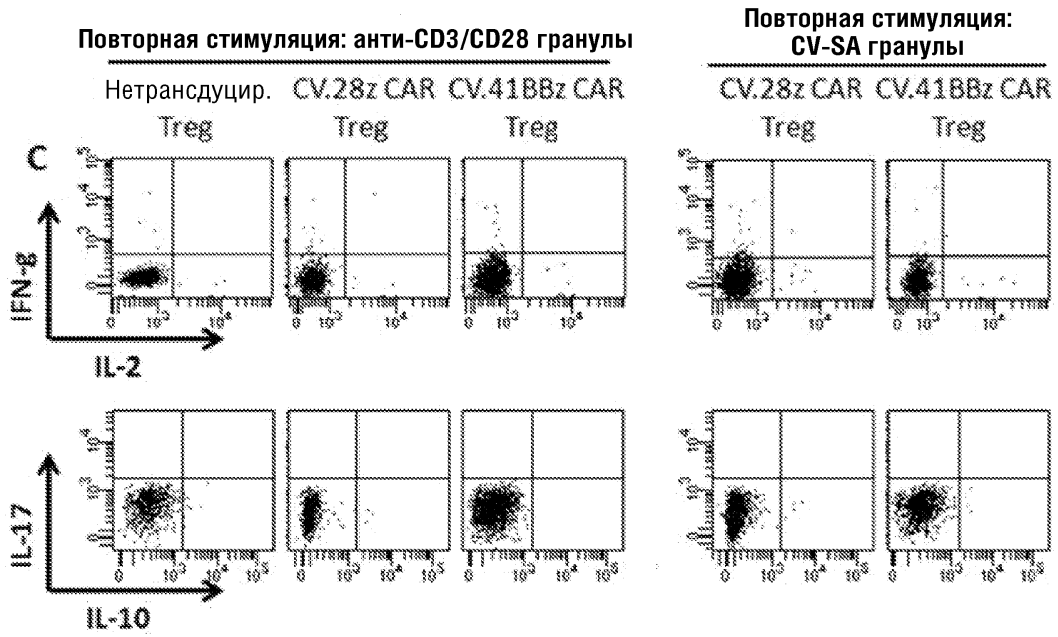
Фиг. 14С



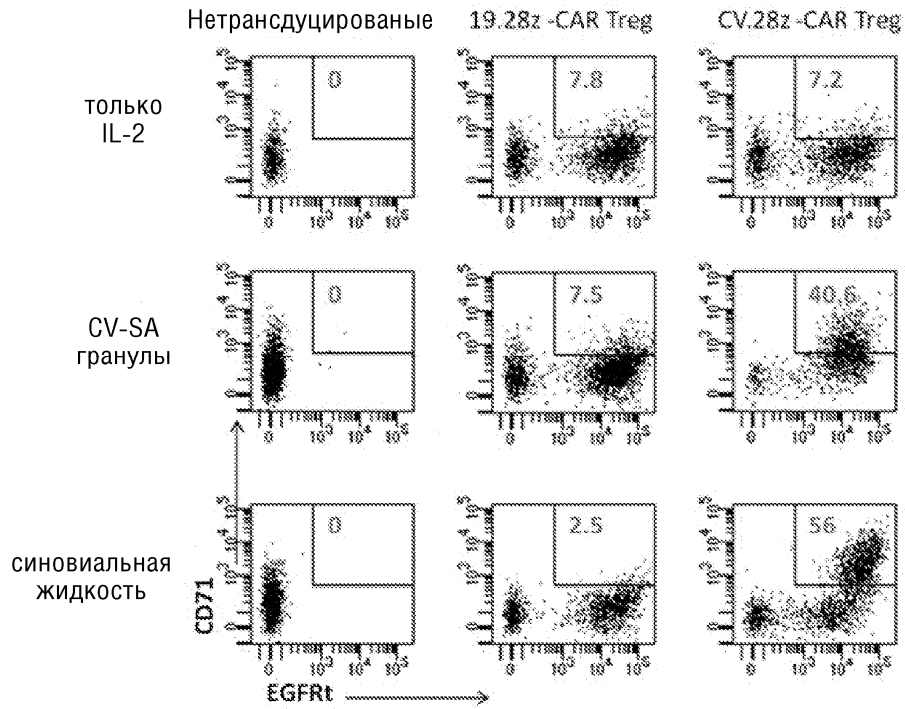
Фиг. 15А



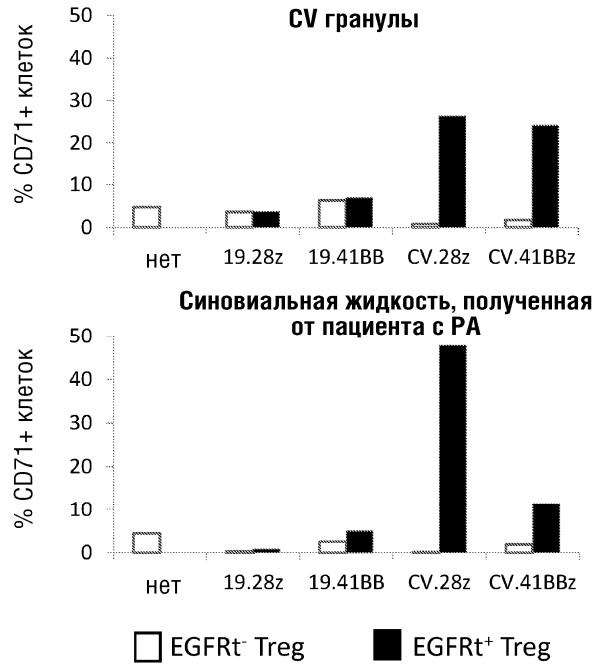
Фиг. 15В



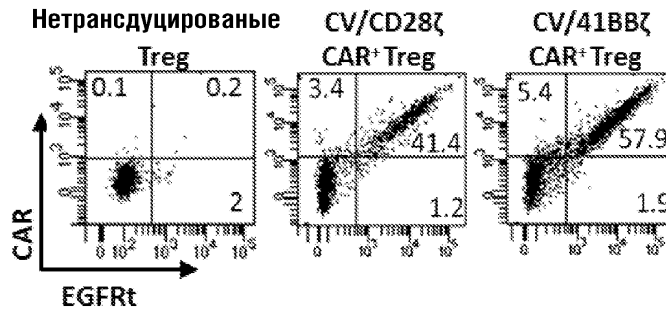
Фиг. 15С



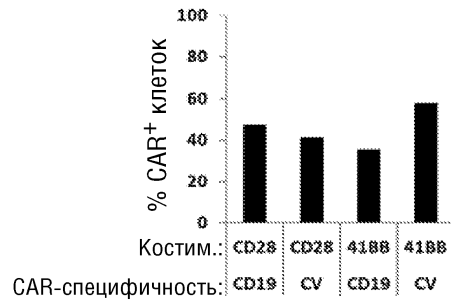
Фиг. 16А



Фиг. 16В

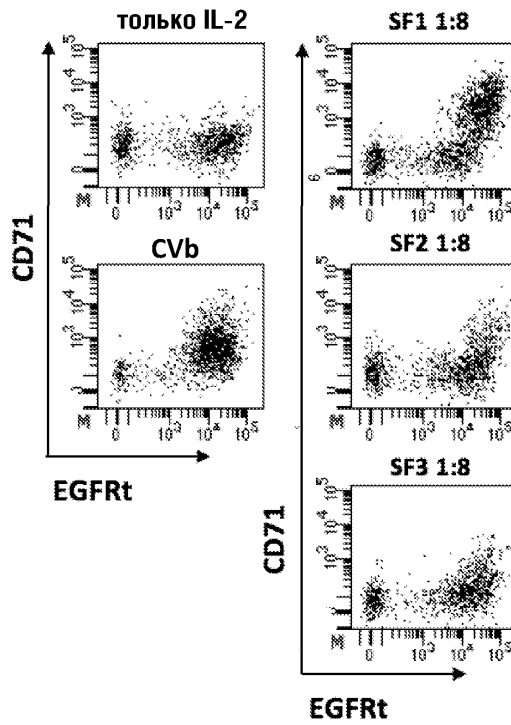


Фиг. 17А

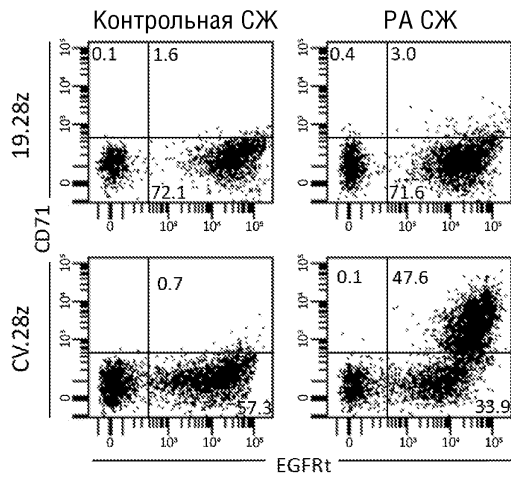


Фиг. 17В

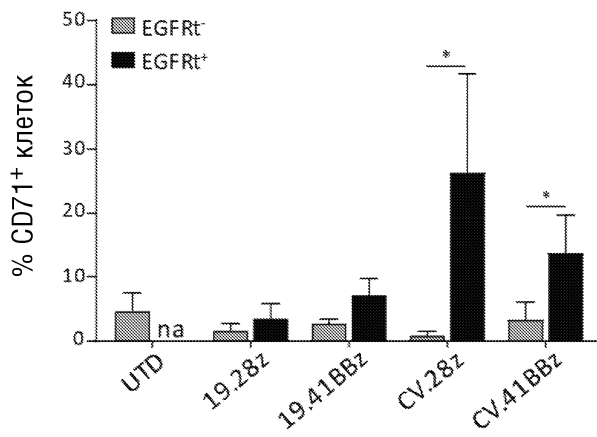
CV.28z CAR Treg



Фиг. 18А

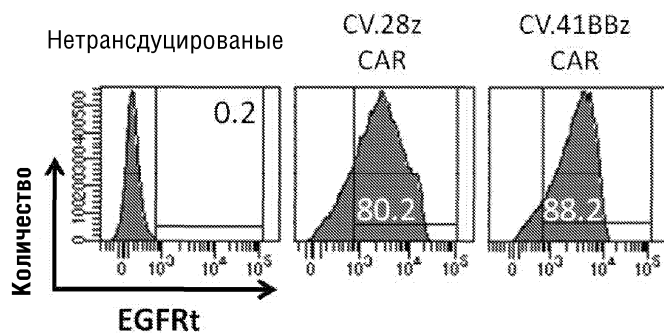


Фиг. 18В

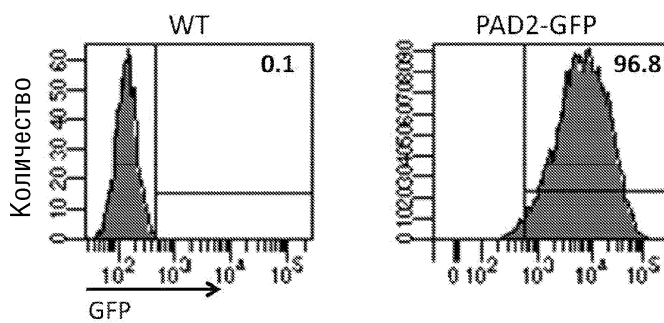


Фиг. 18С

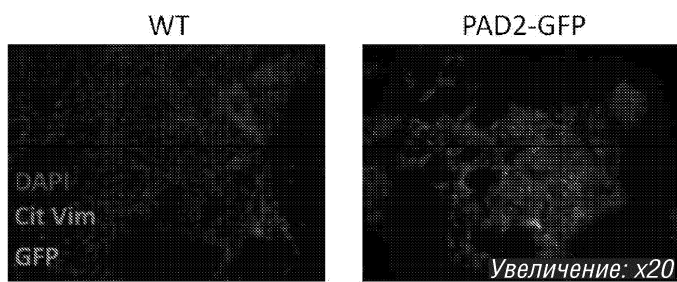




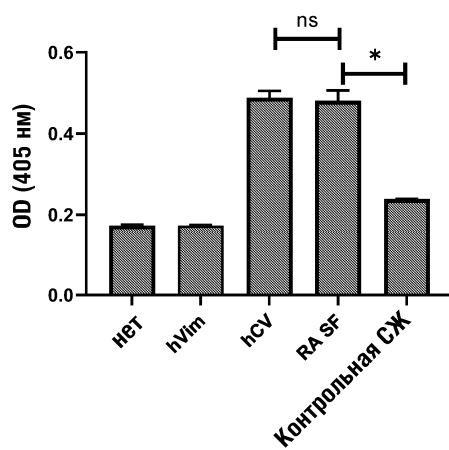
Фиг. 19



Фиг. 20А

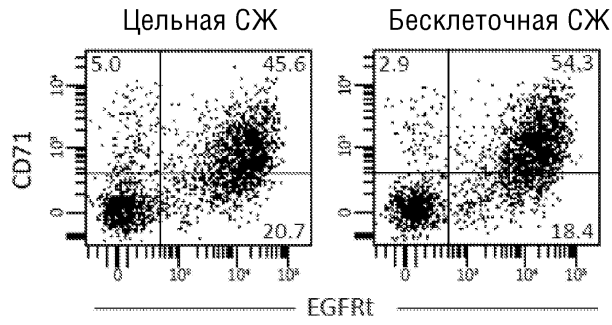


Фиг. 20В

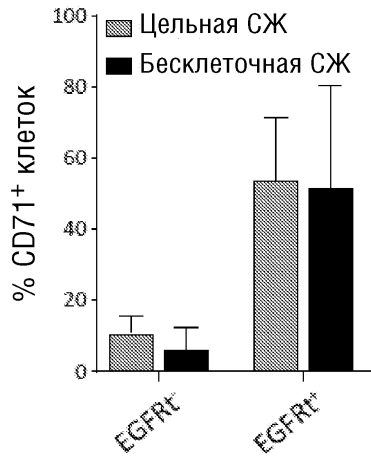


Фиг. 21

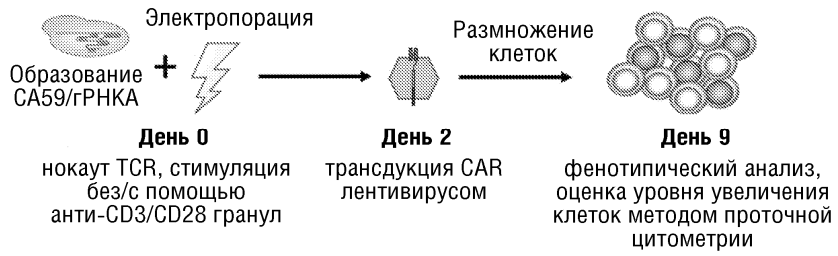
CV.28z CAR Treg



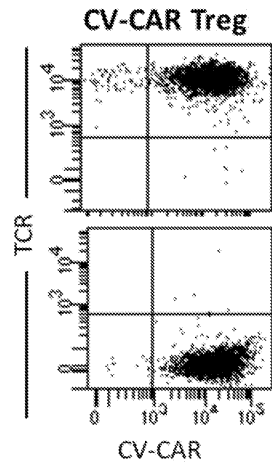
Фиг. 22А



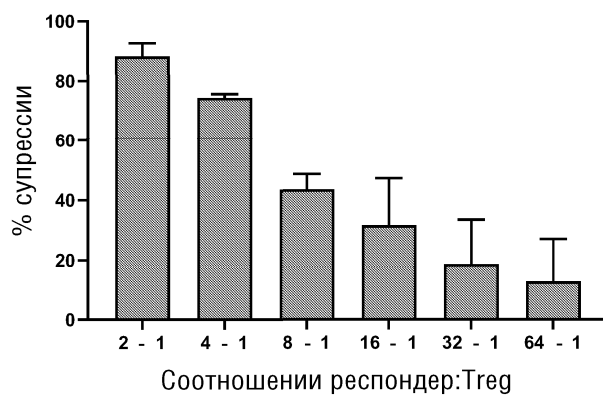
Фиг. 22В



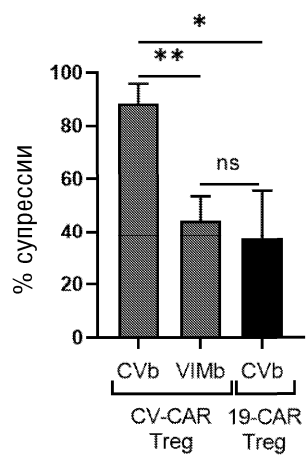
Фиг. 23А



Фиг. 23В



Фиг. 24А



Фиг. 24В

