

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490329 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.04(51) Int. Cl. A61K 35/17 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)(22) Дата подачи заявки
2022.07.29

(54) ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР, СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ДЛЯ СИНОВИАЛЬНОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА, ДЛЯ НАЦЕЛИВАНИЯ НА РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 63/227,320; 63/339,361

(32) 2021.07.29; 2022.05.06

(33) US

(86) PCT/US2022/074321

(87) WO 2023/010122 2023.02.02

(88) 2023.03.02

(71) Заявитель:

СОНОМА БАЙОТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US); КУРАРА АБ (SE)

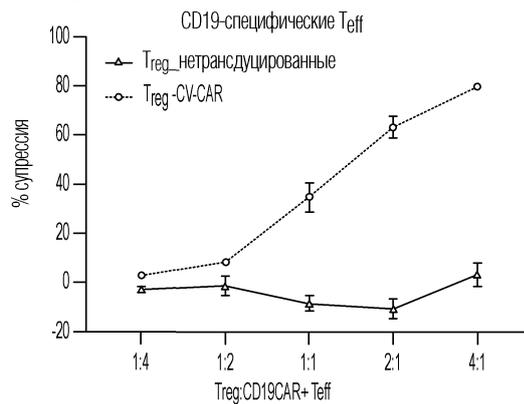
(72) Изобретатель:

Маттеи Джеймс, Ван Дер Вюрст Де
Врис Анне-Рене, Бейлке Джошуа,
Мальмстрем Вивиан, Хупер Кэтрин,
Джонсон Ребекка, Клэрског Ларс (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении раскрыты химерные антигенные рецепторы ("CAR"), содержащие антигенсвязывающий сайт, который распознает цитруллинированные полипептиды. Цитруллинированные полипептиды, такие как цитруллинированный виментин, фибриноген и филаггрин, экспрессируются в синовиальной оболочке пациентов с ревматоидным артритом. Также раскрыты Т-клетки и, в частности, Трег-клетки, которые экспрессируют эти CAR. Введение этих CAR-Т-клеток пригодно в лечении ревматоидного артрита, а также других заболеваний, ассоциированных с цитруллинированными пептидами.



A1

202490329

202490329

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580476EA/085

ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР, СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ДЛЯ СИНОВИАЛЬНОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА, ДЛЯ НАЦЕЛИВАНИЯ НА РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки США № 63/227320, поданной 29 июля 2021 г., и временной заявки США № 63/339361, поданной 6 мая 2022 г., каждая из которых полностью включена в настоящее описание путем ссылки.

Список последовательностей

[0002] Содержание списка последовательностей в электронной форме (237752000340SEQLIST.xml; размер: 50843 байта; дата создания: 28 июля 2022 г.) полностью включено в настоящее описание путем ссылки.

Область техники

[0003] Настоящее изобретение относится к химерным антигенным рецепторам, реагирующим с цитруллинированными антигенами, и регуляторным Т-клеткам, экспрессирующим рецепторы, для лечения аутоиммунных заболеваний.

Уровень техники

[0004] Аутоиммунные заболевания поражают значительное число людей. Например, ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое воспалительное заболевание, поражающее периферические суставы, приводящее к эрозии костной ткани, нарушению подвижности и снижению качества жизни. Им страдает 0,5-1% населения во всем мире, и уровень заболеваемости продолжает расти. Патогенез РА преимущественно локализован в синовиальном суставе, где иммунные клетки, состоящие из Т-клеток, В-клеток, макрофагов и дендритных клеток, инфильтрируют синовиальную оболочку. Кроме того, фибробластоподобные синовиоциты, находящиеся в подстилающем слое синовиальной оболочки, пролиферируют и способствуют повреждению хряща.

[0005] Синовиальная гиперплазия при ревматоидном артрите приводит к инфильтрации синовиальной оболочки иммунными клетками и последующему повреждению хряща и эрозии кости.

[0006] В настоящее время отсутствует лечение РА, как и многих других аутоиммунных заболеваний. Пациентам с РА обычно требуется пожизненное лечение, которое, помимо того, что оно чрезвычайно дорогое, может вызвать серьезные побочные эффекты в долгосрочной перспективе, такие как инфекции и риск развития ревматоидного артрита.

Краткое описание фигур

[0007] Сопровождающие фигуры, которые включены в настоящее описание и составляют часть описания, иллюстрируют примерные варианты осуществления и вместе с описанием дополнительно служат для того, чтобы дать возможность специалистам в

соответствующей области техники создавать и использовать эти варианты осуществления, а также другие варианты осуществления, которые будут очевидны для специалистов в данной области. Изобретение будет более подробно описано со ссылкой на следующие фигуры, где:

[0008] На фиг. 1: исходные данные, включающие промотор MND и остов EGFRt, показали, что CV CAR BVCA1 и SBT01G имели самую сильную ответную реакцию на связанный с планшетом полноразмерный CV (n=2).

[0009] На фиг. 2: результаты анализа с растворимым полноразмерным CV показали дозозависимый ответ только для CV CAR BVCA1 и SBT01G-HL (n=1).

[0010] На фиг. 3: результаты анализа с растворимым пептидом, связанным с частицами, продемонстрировали специфичность связывания (n=1).

[0011] На фиг. 4: MND-SBT01G показал более сильную ответную реакцию на связанный с планшетом, захваченный антителом CV, но не на растворимый CV, чем MND-BVCA1.

[0012] На фиг. 5: тестирование начальной партии синовиальной жидкости из Innovative Research показало, что SBT01G дал более сильные реакции, чем BVCA1.

[0013] На фиг. 6: дальнейшее тестирование 15 образцов синовиальной жидкости от шведских пациентов показало, что для образцов, давших реакцию, SBT01G был сильнее, чем BVCA1.

[0014] На фиг. 7: ответные реакции первичных Treg на синовиальную жидкость (СЖ) демонстрируют, что SBT01G более чувствителен, чем BVCA1, к СЖ от пациентов с РА.

[0015] На фиг. 8: SBT01G, но не BVCA1, также способен реагировать со связанными с планшетом полноразмерной PAD2- цитруллинированным фибриногеном.

[0016] На фиг. 9: SBT01G CAR в качестве эффекторов и Treg реагируют на цитруллинированный фибриноген, в то время как BVCA1 - нет.

[0017] На фиг. 10A-10B: оба промотора EF1A и MND демонстрируют функциональные ответы CV CAR на растворимый пептид, связанный с частицами. Таким образом, промотор CAR не влияет на фенотип Treg.

[0018] На фиг. 11: линкер scFv практически не влияет на функцию SBT01G CAR.

[0019] На фиг. 12A-12B: SBT01G экспрессируется более высоким процентом клеток, чем BVCA1, но BVCA1 и SBT01G CAR-T-клетки имеют сходные профили FoxP3 и Helios.

[0020] На фиг. 13: CV-CAR Treg-клетки (SBT01G), но не нетрансдуцированные Treg-клетки, активируются цитруллинированным виментином (CV). Активация была показана специфическим для целевого антигена увеличением пролиферации, экспрессии CD71 и секреции IL-10.

[0021] На фиг. 14: CV-CAR Treg-клетки реагируют на цитруллинированные белки в синовиальной жидкости от большинства пациентов с РА. Напротив, CV-CAR Treg-клетки не реагируют на синовиальную жидкость от здоровых людей (субъектов без РА).

[0022] На фиг. 15: CV-CAR Treg-клетки (SBT01G), но не нетрансдуцированные Treg-

клетки от двух доноров, специфически активируются синовиальной жидкостью от пациентов с РА.

[0023] На фиг. 16А-16В: оценка супрессивной функции CV-CAR Treg-клеток. На фиг. 16А показано, что CV-CAR Treg-клетки способны подавлять пролиферацию CD3/CD28-предварительно активированных Teff-клеток в присутствии, но не в отсутствии CV. На фиг. 16В показано, что CV-CAR Treg-клетки способны подавлять пролиферацию CD19-CAR Teff-клеток в присутствии CV, в то время как нетрансдуцированные Treg-клетки - нет.

[0024] На фиг. 17: показан временной график активации CV-CAR Treg-клеток человека *in vivo* на мышинной модели воспаления легких, индуцированной липополисахаридом (ЛПС). Вкратце, человеческие CV-CAR Treg-клетки вводили внутривенно (в/в) на сутки 0, человеческий IL-2 вводили внутрибрюшинно (в/б) два раза в сутки, и ЛПС вводили интраназально (и/н) на сутки 0, 1, 6 и 12. На сутки 13 мышей подвергали эвтаназии и отбирали органы для анализа Treg-клеток.

[0025] На фиг. 18А-18В: показаны точечные диаграммы проточной цитометрии, сравнивающие экспрессию эпидермального фактора роста (EGFR) CV-CAR Treg-клетками человека с уровнями в анализе оценки пролиферации клеток Cell Trace Violet (CTV). На фиг. 18А показано, как определяли индекс пролиферации CV-CAR Treg (EGFR+). В частности, индекс пролиферации равен проценту EGFR+,CTV- клеток, деленному на процент EGFR+,CTV- клеток. На фиг. 18В показано, как определяли кратное изменение соотношения EGFR.

[0026] На фиг. 19А-19В: CV-CAR Treg пролиферируют на ЛПС-индуцированной мышинной модели воспаления легких, но не у контрольных реципиентов с PBS. На фиг. 19А показано абсолютное количество CD45+,CD3+ Treg в легких по данным различных исследовательских групп, в то время как на фиг. 19В показан индекс пролиферации Treg в легких по данным различных исследовательских групп.

Сущность изобретения

[0027] Регуляторные Т-клетки (Treg) являются дефектными у пациентов и на мышинных моделях РА. Таким образом, адоптивная клеточная терапия (АКТ) на основе Treg представляет собой многообещающий подход для лечения РА. Фактически, АКТ на основе Treg реверсирует заболевание на животных моделях РА. В настоящем исследовании антитело, выделенное у пациента с РА, использовали для конструирования CAR, специфичного для цитруллинированного виментина (CV) и других посттрансляционно модифицированных белков, обнаруженных на высоком уровне, и почти исключительно в синовиальном внеклеточном матриксе (ECM) пораженных суставов.

[0028] В настоящем изобретении раскрыты химерные антигенные рецепторы (CAR), которые специфически распознают антигены, ассоциированные с аутоиммунными заболеваниями. В частности, CAR могут быть специфичными для посттрансляционно модифицированных антигенов. В частности, CAR могут быть специфичными для связывания с цитруллинированными полипептидами, включая виментин,

цитруллинированный филаггрин и цитруллинированный фибриноген.

[0029] Химерные антигенные рецепторы (CAR) были сконструированы для специфического нацеливания на посттрансляционно модифицированные белки, а именно цитруллинированный виментин, цитруллинированный филаггрин и цитруллинированный фибриноген, которые экспрессируются во внеклеточном матриксе воспаленных суставов у пациентов с ревматоидным артритом (РА). В некоторых вариантах осуществления область одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) CAR получают из антитела, высокоспецифичного к цитруллинированным белкам, выделенным из периферической крови пациента с РА. В одном варианте осуществления специфические цепи scFv вставляли в конструкцию CAR второго поколения. В некоторых вариантах осуществления цепи scFv вставляли в конструкцию CAR, клонированную в лентивирусный вектор. В подробном описании изобретения ссылки на антитела применимы к антигенсвязывающим доменам CAR по настоящему изобретению, если из контекста не следует иное.

Подробное описание изобретения

I. Определения

[0030] Если не указано иное, то термины и обозначения, используемые в биохимии, химии нуклеиновых кислот, молекулярной биологии, биологии развития и молекулярной генетики соответствуют стандартным конвенциям и документам в данной области, например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition (Cold Spring Harbor Press, 1989); Alberts and Singer, *Developmental Biology*, Eighth Edition (Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 2006); Kornberg and Baker, *DNA Replication*, Second Edition (W.H. Freeman, New York, 1992); Gaits, ed., *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1984); Lehninger, *Biochemistry*, Second Edition (Worth Publishers, New York, 1975); Eckstein, ed., *Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach* (Oxford University Press, New York, 1991); и тому подобное.

[0031] В рамках настоящего описания, термины «антиген», «иммуноген» и «мишень антитела» относятся к молекуле, соединению или комплексу, которые распознаются антителом, т.е. могут связываться антителом. Термин может относиться к любой молекуле, которая может распознаваться антителом, например, полипептиду, полинуклеотиду, углеводу, липиду, химической молекуле или их комбинации (например, фосфорилированным или гликозилированным полипептидам и т.д.). Специалистам в данной области должно быть понятно, что данный термин не означает, что молекула является иммуногенной в любом контексте, а просто указывает на то, что на нее может быть нацелено антитело.

[0032] В рамках настоящего описания, термин «эпитоп» относится к локализованному участку антигена, который распознается и связывается антителом. Эпитопы могут включать несколько аминокислот или участки из нескольких аминокислот, например, 5 или 6, или более, например, 20 или более аминокислот, или фрагментов этих аминокислот. В некоторых случаях эпитоп включает небелковые компоненты, например, углеводы, нуклеиновые кислоты или липиды. В некоторых случаях эпитоп представляет

собой трехмерный фрагмент. Таким образом, например, если мишенью является белок, то эпитоп может состоять из последовательных аминокислот или аминокислот из разных участков белка, которые сближаются за счет сворачивания белка (например, прерывистый эпитоп).

[0033] В рамках настоящего описания, термин «антитело» относится к полипептиду, содержащему каркасную область из гена иммуноглобулина, который специфически связывает и распознает антиген. Обычно «вариабельная область» содержит антигенсвязывающую область антитела (или ее функциональный эквивалент) и является наиболее важной с точки зрения специфичности и аффинности связывания. Показательным примером структурной единицы иммуноглобулина (антитела) является тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну «легкую» (приблизительно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (приблизительно 50-70 кДа).

[0034] Антитела могут относиться (i) к любому из пяти основных классов иммуноглобулинов в зависимости от идентичности их константных доменов тяжелой цепи - альфа (IgA), дельта (IgD), эпсилон (IgE), гамма (IgG) и мю (IgG), или (ii) их подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2). Легкие цепи могут представлять собой лямбда- или каппа-цепи.

[0035] Ниже приведен неисчерпывающий список различных форм антител, которые все сохраняют антигенсвязывающую активность:

(1) цельные иммуноглобулины (также называемые «интактные» антитела) (две легкие цепи и две тяжелые цепи, например, тетрамер);

(2) полипептид иммуноглобулина (легкая цепь или тяжелая цепь);

(3) фрагмент антитела, такой как Fv (моновалентный или бивалентный фрагмент вариабельной области, который может содержать только вариабельные области (например, V_L и/или V_H), Fab (V_LC_L V_HC_H), F(ab')₂, Fv (V_L V_H), scFv (одноцепочечный Fv) (полипептид, содержащий V_L и V_H, соединенные линкером, например, пептидным линкером), (scFv)₂, sc(Fv)₂, биспецифический sc(Fv)₂, биспецифический (scFv)₂, минитело (sc(FV)₂, слитый с доменом CH3), диатело (нековалентный димер одноцепочечного фрагмента Fv (scFv), который состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), соединенных небольшим пептидным линкером), триателом является трехвалентный sc(Fv)₃ или триспецифический sc(Fv)₃;

(4) поливалентное антитело (антитело, содержащее связывающие участки, которые связываются с двумя разными эпитопами или белками, например, антитело на основе «скорпион» молекулы;

(5) слитый белок, содержащий связывающий участок иммуноглобулина, слитый с другой аминокислотной последовательностью (такой как флуоресцентный белок); и

(6) антитело, состоящее только из тяжелых цепей, или фрагмент антитела, имеющий только две тяжелые цепи и без двух легких цепей, обычно встречающихся в антителах.

[0036] Получение и свойства tandemных scFv и диател описаны, например, в публикациях Asano et al. (2011) J. Biol. Chem., 286:1812; Kenanova et al. (2010) Prot. Eng.

Design Sel., 23:789; Asano et al. (2008) Prot. Eng. Design Sel., 21:597.

[0037] Выражение «набор последовательностей CDR», используемой в настоящем изобретении, относится к 3 CDR тяжелой цепи и/или 3 CDR легкой цепи конкретного антитела, описанного в настоящем изобретении. Набор последовательностей CDR «легкой цепи» относится к последовательностям CDR легкой цепи. Набор последовательностей CDR «тяжелой цепи» относится к последовательностям CDR тяжелой цепи. «Полный» набор последовательностей CDR относится к последовательностям CDR как тяжелой цепи, так и легкой цепи. CDR определяются на основе выравнивания последовательностей по международной базе данных по иммуногенетике IMGT.

[0038] В рамках настоящего описания, термин «химерное антитело» относится к антителу, имеющему аминокислотные последовательности, полученные от двух или более видов. В одном варианте осуществления переменная область как легкой, так и тяжелой цепей соответствует переменной области антител, полученных от одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т.д.) с желаемой специфичностью, аффинностью и активностью, тогда как константная область гомологична последовательности, полученной от другого вида (обычно от субъекта, получающего терапию, например, человека), чтобы избежать развития иммунного ответа.

[0039] В настоящем изобретении термин «гуманизированное антитело» относится к химерному антителу, в котором CDR, полученные из VH- и VL-областей «нечеловеческого» антитела, обладающего желаемой специфичностью, аффинностью и активностью, привиты на последовательности человеческой каркасной области. В одном варианте осуществления каркасные остатки гуманизированного антитела модифицированы для повышения и оптимизации специфичности, аффинности и активности антитела. Гуманизацию, т.е. замену «нечеловеческих» последовательностей CDR на соответствующие последовательности человеческого антитела, можно осуществить способами, описанными, например, в патентах США № 5545806; 5569825; 5633425; 5661016; публикациях Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992); Morrison, Nature, 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14:845-51 (1996).

[0040] В рамках настоящего описания, термин «человеческое антитело» относится к антителу, продуцированному в организме человека, или антителу, имеющему соответствующую ему аминокислотную последовательность, полученному любым методом, известным в данной области техники.

[0041] Специфичность связывания можно определить с точки зрения сравнительных констант диссоциации (K_d) антитела (или другого нацеливающего фрагмента) для мишени по сравнению с константой диссоциации антитела и других веществ в окружающей среде или вообще неродственных молекул. Более высокое значение (более высокая) K_d представляет собой K_d , которая описывает взаимодействие с более низкой аффинностью. И наоборот, более низкое значение (более низкая) K_d представляет собой K_d , которая описывает взаимодействие с более высокой аффинностью или более прочное связывание.

Только в качестве примера: значение K_d для антитела, специфически связывающегося с мишенью, может быть в фемтомолярном, пикомолярном, наномолярном или микромолярном диапазоне, и значение K_d для антитела, связывающегося с неродственным веществом, может быть в миллимолярном диапазоне или выше. Аффинность связывания по значению K_d может находиться в микромолярном диапазоне (K_D =от 10^{-4} до 10^{-6}), наномолярном диапазоне (K_D =от 10^{-7} М до 10^{-9} М), пикомолярном диапазоне (K_D =от 10^{-10} М до 10^{-12} М) или фемтомолярном диапазоне (K_D =от 10^{-13} М до 10^{-15} М).

[0042] В рамках настоящего описания, антитело «связывает» или «узнает» антиген или эпитоп, если оно связывает антиген или эпитоп с K_d ниже 10^{-4} М (т.е. в микромолярном диапазоне). Термин «связывается» по отношению к типу клеток (например, антитело, которое связывается с опухолевыми клетками) обычно указывает на то, что агент связывается с большинством клеток в чистой популяции этих клеток. Например, антитело, которое связывается с клетками данного типа, обычно связывается, по меньшей мере, с 2/3 клеток в популяции указанных клеток (например, 67, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%). В некоторых случаях связывание с полипептидом можно оценить сравнением связывания антитела с клеткой, которая презентует полипептид, со связыванием (или его отсутствием) антитела с клеткой, которая не экспрессирует полипептид. Специалистам в данной области понятно, что в зависимости от метода и/или порога определения связывания может иметь место некоторая вариабельность. Аффинность антитела к мишени можно определить в соответствии с методами, известными в данной области техники, например, как описано в публикации Ernst et al., *Determination of Equilibrium Dissociation Constants, Therapeutic Monoclonal Antibodies* (Wiley & Sons ed. 2009).

[0043] В рамках настоящего описания, термин «более высокая аффинность» относится к относительной степени связывания антитела, когда антитело X связывается с мишенью Y более прочно (K_{on}) и/или с более низкой константой диссоциации (K_{off}), чем с мишенью Z, и в этом контексте антитело X имеет более высокую аффинность к мишени Y, чем к Z. Аналогично, термин «более низкая аффинность» здесь относится к степени связывания антитела, когда антитело X связывается с мишенью Y менее прочно и/или с большей константой диссоциации, чем с мишенью Z, и в этом контексте антитело X имеет более низкую аффинность к мишени Y, чем к Z. Аффинность связывания между антителом и его целевым антигеном может быть выражена как KA , равная $1/KD$, где KD равна k_{on}/k_{off} . Значения k_{on} и k_{off} можно измерить с использованием технологии поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием Системы молекулярного аффинного скрининга (Sierra Sensors GmbH, Гамбург, Германия). Антагонистическое или блокирующее антитело представляет собой антитело, которое частично или полностью блокирует, ингибирует или нейтрализует биологическую активность, связанную с целевым антигеном, по сравнению с активностью в аналогичных физиологических условиях, когда антитело отсутствует. Антагонисты могут быть конкурентными, неконкурентными или необратимыми. Конкурентный антагонист

представляет собой вещество, которое связывается с природным лигандом или рецептором в том же сайте, в котором имеет место взаимодействие природного лиганда с рецептором, или связывается аллостерически таким образом, что вызывает изменения, предотвращающие нормальное связывание. Неконкурентный антагонист связывается в другом сайте, чем при взаимодействии природного лиганда с рецептором, но снижает КD или сигнал, возникающий в результате взаимодействия. Необратимый ингибитор вызывает ковалентные модификации рецептора, предотвращая любое последующее связывание.

[0044] В рамках настоящего описания, термин «авидность» относится к общей стабильности связывающего комплекса между антителом и антигеном-мишенью. Она определяется тремя факторами: (1) собственной аффинностью антитела к антигену, (2) валентностью антитела и (3) геометрическим расположением взаимодействующих компонентов. Аффинность представляет собой силу взаимодействия между антителом и одной мишенью, тогда как авидность представляет собой суммарную силу многочисленных аффинностей. В одном варианте осуществления антитела, представленные в настоящем изобретении, являются бивалентными.

[0045] В рамках настоящего описания, антитело «предпочтительно связывается» с первым антигеном по сравнению со вторым антигеном, если оно связывает первый антиген с более высокой аффинностью, чем со вторым антигеном. Предпочтительное связывание может характеризоваться более высокой аффинностью по меньшей мере в 2, 5, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500 или 1000 раз.

[0046] В настоящем изобретении выражение антитело «специфически связывается» или «специфично в отношении» целевого антигена или целевой группы антигенов, если оно связывается с целевым антигеном или каждым членом целевой группы антигенов с любым значением аффинности, по меньшей мере выбранным из 1×10^{-6} М, 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М, 1×10^{-11} М, 1×10^{-12} М и, например, связывается с целевым антигеном или каждым членом целевой группы антигенов со аффинностью, которая по меньшей мере в два раза превышает его аффинность к нецелевым антигенам, с которыми его сравнивают. Обычно специфическое связывание характеризуется связыванием антигена с достаточной аффинностью, чтобы антитело можно было использовать в качестве диагностического средства для детектирования антигена или эпитопа и/или в качестве терапевтического агента при нацеливании на антиген или эпитоп.

[0047] В рамках изобретения термин «полипептид» относится к молекуле, имеющей последовательность природных и/или не природных аминокислот, соединенных пептидными связями. Термин «пептид» относится к короткому полипептиду, обычно длиной не более 30 аминокислот. Аминокислотная последовательность полипептида называется его «первичной структурой». Термин «белок» относится к полипептиду, имеющему вторичную, третичную и/или четвертичную структуру, например, структуры, стабилизированные водородными связями, связями между вторичными структурами и структурами, образованными более чем одним белком. Белки могут быть дополнительно модифицированы другими присоединенными молекулами, такими как углеводы

(гликопротеины), липиды (липопротеины), фосфатные группы (фосфопротеины) и т.п.

[0048] В настоящем изобретении аминокислотная последовательность «состоит» только из аминокислот в этой последовательности.

[0049] В настоящем изобретении первая аминокислотная последовательность «состоит по существу» из второй аминокислотной последовательности, если первая аминокислотная последовательность: (1) содержит вторую аминокислотную последовательность и (2) не более чем на 1, не более чем на 2 или не более чем на 3 аминокислоты длиннее второй аминокислотной последовательности.

[0050] В настоящем изобретении первая аминокислотная последовательность представляет собой «фрагмент» второй аминокислотной последовательности, если вторая аминокислотная последовательность содержит первую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления первая аминокислотная последовательность, которая является фрагментом второй аминокислотной последовательности, может содержать не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот меньше, чем вторая аминокислотная последовательность.

[0051] В настоящем изобретении «функциональный эквивалент» референтной аминокислотной последовательности представляет собой последовательность, которая не идентична референтной последовательности, и содержит незначительные изменения, например, такие как вставка, делеция или замена одной или более аминокислот. Функционально эквивалентная последовательность сохраняет функцию (например, иммуногенность) референтной последовательности, которой она эквивалентна. Если функционально эквивалентная аминокислотная последовательность содержит замену одной или более аминокислот по отношению к референтной последовательности, то обычно это будут консервативные аминокислотные замены.

[0052] В настоящем изобретении «консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой один аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком без отмены желаемых свойств белка. Подходящие консервативные аминокислотные замены могут быть сделаны заменой аминокислот с аналогичной гидрофобностью, полярностью и длиной R-цепи на другие. См., например, Watson, et al., «Molecular Biology of the Gene», 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., Menlo Park, CA, p. 224. Примеры консервативных аминокислотных замен включают следующее (примечание: некоторые группы не являются взаимоисключающими):

Консервативные замены	
Тип аминокислоты	Заменяемые аминокислоты
Гидрофильные	Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr
Сульфгидрильные	Cys
Алифатические (неполярные, гидрофобные)	Ala, Val, Ile, Leu, Met, Gly, Pro
Основные	Lys, Arg, His
Ароматические	Phe, Tyr, Trp

[0053] В настоящем изобретении термин «по существу идентичные» относится к идентичности между первой аминокислотной последовательностью, которая содержит достаточное или минимальное число аминокислотных остатков, i) идентичных к или ii) представляющих консервативные замены выровненных аминокислотных остатков во второй аминокислотной последовательности так, что первая и вторая аминокислотные последовательности могут иметь общий структурный домен и/или общую функциональную активность, и/или общую иммуногенность. Например, аминокислотные последовательности, которые содержат общий структурный или антигенный домен, имеющий по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность, называются достаточно или по существу идентичными. В контексте нуклеотидной последовательности термин «по существу идентичные» используется здесь для обозначения первой последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит достаточное или минимальное число нуклеотидов, которые идентичны выровненным нуклеотидам во второй последовательности нуклеиновой кислоты, так что первая и вторые нуклеотидные последовательности кодируют полипептид, обладающий общей функциональной активностью, или кодируют общий структурный полипептидный домен, или общую функциональную полипептидную активность, или кодируют полипептиды, обладающие одинаковыми иммуногенными свойствами.

[0054] В рамках настоящего описания, химическое соединение, такое как полипептид, является «по существу чистым» или «выделенным», если оно является преобладающим химическим соединением своего типа (например, среди полипептидов) в композиции. Сюда входит химическое соединение, представляющее собой более 50%, более 80%, более 90%, более 95%, более 98%, более 99%, более 99,5%, более 99,9% или более 99,99% химических соединений такого типа в составе. По существу очищенная фракция представляет собой композицию, в которой целевой вид содержит по меньшей мере приблизительно 50% (на молярной основе) от всех присутствующих макромолекулярных соединений. Как правило, по существу чистая композиция означает, что от приблизительно 80% до 90% или более макромолекулярных соединений, присутствующих в композиции, представляют собой представляющие интерес очищенные соединения. Соединение очищается до необходимой гомогенности (примеси невозможно обнаружить в композиции обычными методами детектирования), если композиция состоит

по существу из одних макромолекулярных соединений. Растворители, небольшие молекулы, стабилизаторы (например, BSA) и элементарные ионы не считаются макромолекулярными соединениями для целей данного определения.

[0055] Выражение «выделенное антитело» относится к антителу, полученному *in vivo* или *in vitro*, которое было выделено из источника, продуцирующего антитело, например, организма животного, гибридомы или другой клеточной линии (например, рекомбинантных клеток насекомых, дрожжей или бактерий, которые продуцируют антитело).

[0056] Термин «идентичность последовательности», используемый здесь, относится к проценту идентичности последовательностей между двумя полипептидными последовательностями или двумя нуклеиновокислотными последовательностями. Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновокислотных последовательностей, последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения (например, в первую аминокислотную последовательность или нуклеиновокислотную последовательность можно ввести гэпы для оптимального выравнивания со второй аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательностью). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных положениях или нуклеотидных положениях. Когда положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то тогда молекулы идентичны по этому положению. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % идентичности=число идентичных перекрывающихся положений/общее число положений, умноженное на 100%). В одном варианте осуществления две последовательности имеют одинаковую длину. Определение процента идентичности между двумя последовательностями также может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 215:403. Поиск нуклеотидов BLAST может выполняться с набором параметров нуклеотидной программы NBLAST, например, оценка=100, длина слова=12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Поиск белков BLAST может выполняться с набором параметров программы XBLAST, например, оценка=50, длина слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковой молекуле, описанной здесь. Для получения выравниваний с гэпами в целях сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. Альтернативно, PSI-BLAST можно использовать для выполнения повторяющегося поиска, который выявляет дистанционные связи между молекулами (смотри выше). При

использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, веб-сайт NCBI). Другим предпочтительным, неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers и Miller, 1988, CABIOS 4:11-17. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весов остатков PAM120, штраф за длину гэпа 12 и штраф за гэп 4. Процент идентичности между двумя последовательностями можно определить с использованием методов, аналогичных описанным выше, с учетом или без допуска гэпов. При вычислении процента идентичности обычно учитываются только точные совпадения.

[0057] Для антител процентную идентичность последовательностей можно определить, когда последовательности антител максимально выровнены с использованием базы данных IMGT. После выравнивания, если область данного антитела (например, вся зрелая вариабельная область тяжелой или легкой цепи) сравнивается с той же областью референтного антитела, то процентная идентичность последовательностей между данными областями и областями референтного антитела представляет собой число положений, занятых одной и той же аминокислотой как в данной области, так и в области референтного антитела, деленное на общее число выровненных положений двух областей, умноженное на 100 для перевода в проценты.

[0058] Процент идентичности аминокислотных последовательностей также можно определить с использованием программы сравнения последовательностей NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). Программу сравнения последовательностей NCBI-BLAST2 можно получить из Национального института здравоохранения, Бетесда, Мэриленд. В программе NCBI-BLAST2 используется несколько параметров поиска, где для всех этих параметров поиска установлены значения по умолчанию, включая, например, (unmask)=да (yes), цепь (strand)=все (all), ожидаемые события (expected occurrences)=10, длина с минимально низкой сложностью (minimum low complexity length)=15/5, многопроходная e-величина (multi-pass e-value)=0,01, константа для многопроходного алгоритма (constant for multi-pass)=25, отсечение для конечного выравнивания с гэпами (dropoff for final gapped alignment)=25 и оценочная матрица=BLOSUM62.

[0059] В ситуациях, когда NCBI-BLAST2 используется для сравнения аминокислотных последовательностей, то % идентичность аминокислотной последовательности данной аминокислотной последовательности А к, с или против данной аминокислотной последовательности В (которая альтернативно может называться как данная аминокислотная А, которая имеет определенный процент идентичности аминокислотной последовательности к, с или против данной аминокислотной последовательности В), рассчитывается следующим образом: 100 умножить на дробь X/Y,

где X представляет собой число аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения с использованием программы выравнивания последовательностей NCBI-BLAST2 при выравнивании этой программой последовательностей A и B, и где Y представляет собой общее число аминокислотных остатков в B. Следует понимать, что когда длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, то % идентичность аминокислотных последовательностей A к B не будет равна % идентичности аминокислотных последовательностей B к A. Термин «последовательность нуклеиновой кислоты», используемый здесь, относится к последовательности из нуклеозидных или нуклеотидных мономеров, состоящих из встречающихся в природе оснований, сахаров и гликозидных (остов) связей, и включает кДНК. Данный термин также включает модифицированные или замещенные последовательности, содержащие неприродные мономеры или их фрагменты. Последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут представлять собой последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или последовательности рибонуклеиновой кислоты (РНК) и могут включать встречающиеся в природе основания, включая аденин, гуанин, цитозин, тимидин и урацил. Последовательности также могут содержать модифицированные основания. Примеры таких модифицированных оснований включают аза- и деаза-аденин, -гуанин, -цитозин, -тимидин и -урацил; и ксантин и гипоксантин. Понятно, что полинуклеотиды, содержащие нетранскрибируемые нуклеотидные основания, могут быть пригодны в качестве зондов, например, в анализах гибридизации. Нуклеиновая кислота может быть либо двухцепочечной, либо одноцепочечной, и представляет собой смысловую или антисмысловую цепь. Кроме того, термин «нуклеиновая кислота» включает комплементарные последовательности нуклеиновой кислоты, а также кодон-оптимизированные или эквиваленты синонимических кодонов.

[0060] Термин «выделенная нуклеиновая кислота», используемый здесь, относится к нуклеиновой кислоте, по существу не содержащей клеточного материала или культуральной среды, когда она получена с использованием методов рекомбинантной ДНК, или химических предшественников или других химических веществ в случае химического синтеза. Выделенная нуклеиновая кислота также практически не содержит последовательностей, которые естественным образом фланкируют нуклеиновую кислоту (т.е. последовательностей, расположенных на 5'- и 3'-концах нуклеиновой кислоты), из которых получена нуклеиновая кислота.

[0061] Гибридизация может происходить со всей молекулой последовательности нуклеиновой кислоты или с ее частью. Подвергающийся гибридизации участок обычно имеет длину по меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30, 40 или 50) нуклеотидов. Специалисту в данной области должно быть понятно, что стабильность дуплекса или гибридов нуклеиновых кислот определяется температурой плавления T_m , которая в натрий-содержащих буферах является функцией концентрации ионов натрия и температуры ($T_m = 81,5^\circ\text{C} - 16,6 (\text{Log}_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41(\%(\text{G}+\text{C}) - 600/l)$) или аналогичное

уравнение). Соответственно, параметрами условий промывки, определяющими стабильность гибрида, являются концентрация ионов натрия и температура. Для идентификации сходных молекул, но не идентичных, известной молекуле нуклеиновой кислоты, можно допустить 1% несовпадение, что выразится в понижении T_m приблизительно на 1°C , например, если проводится поиск молекулы нуклеиновой кислоты с идентичностью $>95\%$, то конечную температуру раствора можно понизить приблизительно на 5°C . Основываясь на этих соображениях, специалисты в данной области смогут легко выбрать подходящие условия гибридизации. В предпочтительных вариантах выбирают жесткие условия гибридизации. В качестве примера для достижения жесткой гибридизации можно использовать следующие условия: гибридизация с использованием $5\times$ хлорида натрия/цитрата натрия (SSC)/ $5\times$ раствора Денхардта/1,0% SDS при $T_m - 5^\circ\text{C}$, основываясь на вышеприведенном уравнении с последующей промывкой $0,2\times$ SSC/0,1% SDS при 60°C . Условия гибридизации средней жесткости включают стадию промывки при $3\times$ SSC при 42°C . Однако понятно, что эквивалентные условия по жесткости можно достичь с использованием альтернативных буферов, солей и температур. Дополнительные рекомендации относительно условий гибридизации можно найти в следующих источниках: *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y., 2002, и в: Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[0062] В настоящем изобретении термин «экспрессионная конструкция» относится к полинуклеотиду, содержащему контрольную последовательность экспрессии, операбельно связанную с гетерологичной нуклеотидной последовательностью (т.е. последовательностью, с которой контрольная последовательность экспрессии в природе обычно не связана), которая должна быть объектом экспрессии. В настоящем изобретении термин «экспрессионный вектор» относится к полинуклеотиду, содержащему экспрессионную конструкцию и последовательности, достаточные для репликации в клетке-хозяине или вставки в хромосому хозяина. Плазмиды и вирусы являются примерами экспрессионных векторов. В настоящем изобретении термин «контрольная последовательность экспрессии» относится к нуклеотидной последовательности, которая регулирует транскрипцию и/или трансляцию нуклеотидной последовательности, операбельно связанной с ней. Контрольные последовательности экспрессии включают промоторы, энхансеры, репрессоры (последовательности, регулирующие транскрипцию) и сайты связывания рибосомы (последовательности, регулирующие трансляцию).

[0063] В настоящем изобретении нуклеотидная последовательность «операбельно связана» с контрольной последовательностью экспрессии, когда контрольная последовательность экспрессии функционирует в клетке для регуляции транскрипции нуклеотидной последовательности. Это включает стимулирование транскрипции нуклеотидной последовательности посредством взаимодействия между полимеразой и промотором.

[0064] Термин «вектор», используемый в настоящем изобретении, включает любой промежуточный носитель для молекулы нуклеиновой кислоты, который позволяет,

например, ввести указанную молекулу нуклеиновой кислоты в прокариотические и/или эукариотические клетки и/или интегрировать в геном, и включает плазмиды, фагмиды, бактериофаги или вирусные векторы, такие как векторы на основе ретровирусов, лентивирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы и т.п. Термин «плазида», используемый здесь, обычно относится к конструкции из внехромосомного генетического материала, обычно кольцевому дуплексу ДНК, который может реплицироваться независимо от хромосомной ДНК.

[0065] «Трансфекция» относится к введению нового генетического материала в клетку. Она включает трансформацию (прямое поглощение и включение экзогенного генетического материала из окружающей среды через клеточную мембрану), трансдукцию (введение чужеродной ДНК вирусом-бактериофагом в клетку-хозяина) и конъюгацию.

[0066] В рамках настоящего описания, термин «клетка-хозяин» относится к рекомбинантной клетке, содержащей экспрессионную конструкцию.

[0067] В настоящем изобретении термин «биологический образец» относится к образцу, содержащему клетки (например, опухолевые клетки) или биологические молекулы, полученные из клеток.

[0068] В рамках настоящего описания, термины «терапия», «лечение», «терапевтическое вмешательство» и «ослабление» относятся к любой активности, приводящей к снижению тяжести симптомов. Термины «лечить» и «предотвращать» не являются абсолютными терминами. Лечение и профилактика могут относиться к любому из следующих эффектов: задержке начала развития симптомов, облегчению симптомов, повышению выживаемости пациентов, увеличению времени или уровня выживаемости и т. д. Лечение и профилактика могут быть полными или частичными. Эффект лечения можно сравнить с субъектом или группой субъектов, не получающих лечение, или с одним тем же пациентом до лечения или в другой период во время лечения. В некоторых аспектах тяжесть заболевания снижается, по меньшей мере, на 10% по сравнению, например, с субъектом до введения или с контрольным субъектом, не получающим лечение. В некоторых аспектах тяжесть заболевания снижается по меньшей мере на 25%, 50%, 75%, 80% или 90%, и в некоторых случаях заболевание невозможно выявить с помощью стандартных диагностических методов. «Проводить лечение» и «лечение» также могут означать повышение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в случае отсутствия лечения. Термины «проводить лечение» и «лечение», используемые здесь, также включают профилактическое лечение.

[0069] Композиции или способы, «содержащие» или «включающие» один или более перечисленных элементов, могут включать другие элементы, не указанные конкретно (например, открытые термины, означающие включающий, но не ограничивающийся этим). Например, композиция, которая «содержит» или «включает» антитело, может содержать антитело одно или в комбинации с другими ингредиентами. В противоположность, выражение «состоящий из» является закрытым, указывая на то, что такие варианты осуществления не включают дополнительные элементы. Термин «состоящий по существу

из» относится к включению перечисленных элементов и других элементов, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики заявленной комбинации (например, частично закрытый термин). Понятно, что аспекты и варианты осуществления, описанные здесь как «содержащие», включают «состоящие из» и «состоящие по существу из» вариантов осуществления.

[0070] В настоящем изобретении используются следующие значения, если не указано иное. Используемое в заявке слово «может» используется в разрешающем смысле (то есть, оно означает «имеющий потенциальную возможность»), а не в обязательном смысле (то есть, когда оно означает «должен»). Формы единственного числа включают ссылки на множественное число. Так, например, ссылка на «элемент» включает комбинацию двух или более элементов, несмотря на использование других терминов и выражений для одного или более элементов, таких как «один или более». Выражение «по меньшей мере один» включает «один», «один или более», «один или множество» и «множество». Термин «или», если не указано иное, неисключительный, т. е. включает в себя как «и», так и «или». Термин «любой из» между модификатором и последовательностью означает, что модификатор модифицирует каждый член последовательности. Так, например, выражение «по меньшей мере любое из 1, 2 или 3» означает «по меньшей мере 1, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3».

II. Химерные антигенные рецепторы

[0071] «Химерные антигенные рецепторы» или «CAR» представляют собой сконструированные молекулы, содержащие необязательный сигнальный пептид, мишень-связывающий домен, необязательную шарнирную область, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен и необязательный костимулирующий домен. CAR основаны на структуре T-клеточных рецепторов, которые экспрессируются на T-клетках и участвуют в клеточно-опосредованном иммунном ответе. «Мишень-связывающий домен» также упоминается в настоящем изобретении как «антигенсвязывающий домен», и как таковой термин «мишень» включает в себя «антиген».

[0072] Так называемые CAR «первого поколения» имели нацеливающий домен и домен сигнальной трансдукции CD3 ζ . Так называемые CAR «второго поколения» дополнительно включали костимулирующий домен, такой как домен CD28 или 4-1BB. Так называемые CAR «третьего поколения» содержат многочисленные костимулирующие домены. Так называемые CAR «четвертого поколения», также называемые «TRUCS» (T-клетки, перенаправленные на инициируемый антигеном выброс цитокинов), сконструированы для высвобождения трансгенного цитокина при передаче сигнала CAR.

[0073] Химерные антигенные рецепторы («CAR») включают следующие элементы: (1) необязательный сигнальный пептид, (2) мишень-связывающий домен, (3) необязательную шарнирную область; (4) трансмембранную область; (5) внутриклеточный домен, содержащий домен сигнальной трансдукции. Необязательно, CAR может включать любой из: домена сигнальной трансдукции CD3 ζ , домена сигнальной трансдукции Fc-рецептора, костимулирующего (сигнального) домена. То есть, эти необязательные

элементы могут быть включены в дополнение к другим необязательным элементам или вместо них. Мишень-связывающий домен является гетерологичным по отношению, по меньшей мере, к одному из других доменов. То есть, мишень-связывающий домен в природе не встречается на Т-клеточном рецепторе или не находится в том же белке, что и по меньшей мере один из других доменов.

[0074] «Мишень-связывающий домен» обеспечивает специфичность связывания CAR. «Сигнальный пептид» направляет полипептид через клеточную мембрану. Мишень-связывающий домен может связываться с доменом антитела, который связывается с антигеном-мишенью, образуя так называемый «универсальный CAR». «Шарнирная область» представляет собой гибкую соединительную область, например, природного или синтетического полипептида или молекулы любого другого типа, обеспечивающую структурную гибкость и расстояние между фланкирующими полипептидными областями. «Трансмембранный домен» представляет собой трансмембранный белковый домен, обычно гидрофобный. «Домен сигнальной трансдукции» или «сигнальный домен» передает сигнал через путь сигнальной трансдукции в клетку при связывании. Такая передача сигналов активирует активность клетки. «Костимулирующие домены» представляют собой дополнительные сигнальные домены, которые дополнительно передают сигналы.

[0075] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит:

(i) мишень-связывающий домен (также называемый в настоящем изобретении антигенсвязывающим доменом), реагирующий с цитруллинированным белком или его цитруллинированным фрагментом, таким как VH-VL или VL-VH, где два переменных домена разделены гибким линкером длиной от 15 до 25 аминокислот;

(ii) шарнирную область;

(iii) костимулирующий домен; и

(iv) внутриклеточный сигнальный домен (также называемый здесь доменом активации). То есть, в некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, слитый с платформой CAR, содержащей шарнирную область, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, содержащий костимулирующий домен и домен активации. CAR может дополнительно включать сигнальный пептид (также называемый здесь лидерной последовательностью) для направления экспрессии CAR на поверхность клетки, такой как Treg.

[0076] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, слитый в рамке считывания с платформой CAR, содержащей аминокислотные последовательности SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:28 и SEQ ID:19. В других вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, слитый в рамке считывания с платформой CAR, содержащей аминокислотные последовательности SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:28 и SEQ ID:19. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, слитый в рамке считывания с платформой CAR, содержащей аминокислотные последовательности SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:16,

SEQ ID NO:29 и SEQ ID:19. В других вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, слитый в рамке считывания с платформой CAR, содержащей аминокислотные последовательности SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:29 и SEQ ID:19.

А. Сигнальный пептид

[0077] Сигнальный пептид может представлять собой любой пептид, функция которого позволяет полипептиду проникать через клеточную мембрану. Сигнальный пептид может происходить из CD4, CD8, CD28, TLR или рецепторов семейства иммуноглобулинов.

[0078] Например, сигнальный пептид может содержать последовательность:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (SEQ ID NO:18); или

MALPVTALLPLALLLHAAR (SEQ ID NO:23).

В. Мишень-связывающий домен

1. Структура

[0079] Мишень-связывающий домен может включать любой полипептид, имеющий функцию связывания с мишенью, например, антитело, как определено в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления мишень-связывающий домен может иметь форму антитела, сохраняющую антигенсвязывающую активность, как определено в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления мишень-связывающий домен может содержать одноцепочечное антитело (scFv). scFv может быть связан с трансмембранным доменом через шарнирную область, длина, гибкость и происхождение которой обеспечивают вариабельность конструкции CAR, и может, наряду с трансмембранным доменом, способствовать взаимодействию с антигеном, образованию иммунологического синапса и влиять на ассоциацию CAR с дополнительными белками, необходимыми для надежной передачи сигнала активации.

2. Мишени/Антигены

[0080] Химерные антигенные рецепторы, раскрытые в настоящем изобретении, содержат мишень-связывающий домен (также называемый здесь антигенсвязывающим доменом), который связывается с цитруллинированными антигенами, например, обнаруженными в синовиальной оболочке субъектов с ревматоидным артритом. В частности, мишень-связывающий домен может связываться с одним или более из: (i) цитруллинированного виментина, (ii) цитруллинированного филаггрина, (iii) цитруллинированного фибриногена и (iv) их цитруллинированных пептидов. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен может связываться с цитруллинированным пептидным фрагментом (i)-(iii), где пептидный фрагмент имеет длину по меньшей мере из 10 аминокислот, например, по меньшей мере 12 аминокислот, по меньшей мере 14 аминокислот или по меньшей мере 16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен дополнительно связывается с тенасцином С. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен может связываться с двумя или более из: (i) цитруллинированного виментина, (ii)

цитруллинированного филагтрина, (iii) цитруллинированного фибриногена и (iv) тенасцина С, или их цитруллинированных пептидных фрагментов.

[0081] В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен представляет собой один или более цитруллинированных пептидов, выбранных из следующих последовательностей:

ST(Cit)SVSSSSY(Cit)(Cit)MFGG (SEQ ID NO:24);

VYAT(Cit)SSAV(Cit)L(Cit)SSV (SEQ ID NO:25);

(Cit)PAPPISGGGY(Cit)A(Cit) (SEQ ID NO:26);

SHQUEST(Cit)GRSRGRSGRSGS (SEQ ID NO:27).

[0082] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с одним или более цитруллинированными пептидами, но не связывается с нецитруллинированными аналогами. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с цитруллинированным пептидом виментина, представленным как SEQ ID NO:24, но не с STRSVSSSSYRRMFGG (SEQ ID NO:45). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с цитруллинированным пептидом виментина, представленным как SEQ ID NO:25, но не с VYATRSSAVRLRSSV (SEQ ID NO:46). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с цитруллинированным пептидом фибриногена, представленным как SEQ ID NO:26, но не с RPAPPISGGGYRAR (SEQ ID NO:47). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с цитруллинированным пептидом филагтрина, представленным как SEQ ID NO:27, но не с SHQESTRGRSRGRSGRSGS (SEQ ID NO:48).

[0083] Мишень-связывающий домен может содержать последовательности из VH- и VL-домена антитела. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен может содержать последовательности антитела, состоящего только из тяжелой цепи, или фрагмент антитела, имеющий только два VH-домена. Сюда входят определенные наборы CDR из VH-и VL-доменов. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит CDR из VH-доменов с SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит CDR из VL-доменов с SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит CDR из VH- и VL- доменов с SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:3 соответственно. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит CDR из VH- и VL-доменов с SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:4 соответственно. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит CDR из VH-и VL-доменов с SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3 соответственно. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит CDR из VH и VL-доменов с SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4 соответственно.

[0084] В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит определяющие комплементарность участки (CDR) из VH и VL-доменов с SEQ ID NO:1 (SBT01 VH (M)) и SEQ ID NO:4 (SBT01 VL (G)). В некоторых вариантах

осуществления VH-домен мишень-связывающего домена содержит VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и VH- CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и VL-домен мишень-связывающего домена содержит VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 и VL-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

Область	SEQ ID	Последовательность фрагмента	Остатки	Длина
HFR1	NO:31	HLHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGS IN	1-30	30
CDR-H1	NO:32	DTTTYWG	31-37	7
HFR2	NO:33	WIRQPPGKGLEWIG	38-51	14
CDR-H2	NO:34	SIYYRGNTHYNSSLRS	52-67	16
HFR3	NO:35	RVTMSVDTSKNRFSKLVTSVTAADTAV YYCAR	68-99	32
CDR-H3	NO:36	LDPFDY	100-105	6
HFR4	NO:37	WGRGTLVTVSS	106-116	11
Область	SEQ ID	Последовательность фрагмента	Остатки	Длина
LFR1	NO:38	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITC	1-22	22
CDR-L1	NO:39	GGNNIGSKSVH	23-33	11
LFR2	NO:40	WYQQKPGQAPLVLIY	34-48	15
CDR-L2	NO:41	YSDRPS	49-55	7
LFR3	NO:42	GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDE ADYYC	56-87	32
CDR-L3	NO:43	QVWDSSSDHQV	88-98	11
LFR4	NO:44	FGTGTKVTV	99- 108	11

[0085] В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит последовательности VH, выбранные из:

(1) SBT01 VH (M)

HLHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSINDTTYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYY
RGNTHYNSSLRSRVTMSVDTSKNRFSKLVTSVTAADTAVYYCARLDPFDYWGRGTLVT
VSS (SEQ ID NO:1);

(2) SBT01 VH (G)

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS
GSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDPFDYWGRGTLVTVS
S (SEQ ID NO:2); или

последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентичность последовательности с вышеуказанными последовательностями, при условии, что мишень-связывающий домен связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении.

[0086] Мишень-связывающий домен может содержать последовательности VL, выбранные из:

(1) SBT01 VL (M)

SYVLTQPPSVSLAPGETATITCGGDDIENQNVNHWYQQKSGQAPMLLIFFDTRRPS
GIPERFSGSRSEDTANLTITRVEAGDDADYFCQVYDRKTDHQVFGPGTTVTVL (SEQ ID
NO:3);

(2) SBT01 VL (G)

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPS
GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHQVFGTGTKVTVL (SEQ ID
NO:4); или

последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентичность последовательности с вышеуказанными последовательностями, при условии, что мишень-связывающий домен связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении.

[0087] В еще одном варианте осуществления антигенсвязывающая область содержит scFV, содержащий один или более VH-доменов, содержащих аминокислотную последовательность VH-доменов SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая область содержит scFV, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении.

[0088] В некоторых вариантах осуществления scFV содержит VL- домены с SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая область содержит scFV, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO:4, при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении.

[0089] В некоторых вариантах осуществления фрагмент scFV содержит VH- и VL- домены с SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:3 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая область содержит scFV, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO:3, при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления линкер, выбранный из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22, располагается между VH- и VL-доменами.

[0090] В некоторых вариантах осуществления фрагмент scFV содержит VH- и VL-

домены с SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:4 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая область содержит scFV, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO:4 при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления линкер, выбранный из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22, располагается между VH- и VL-доменами.

[0091] В некоторых вариантах осуществления фрагмент scFV содержит VH- и VL-домены с SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая область содержит scFV, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления линкер, выбранный из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22, располагается между VH- и VL-доменами.

[0092] В некоторых вариантах осуществления фрагмент scFV содержит VH- и VL-домены с SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая область содержит scFV, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления линкер, выбранный из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22, располагается между VH- и VL-доменами.

[0093] В еще одном варианте осуществления антигенсвязывающая область содержит scFV, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из:

SBT01G - VHVL - линкер GGGs×3 - pSB_0149

HLHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINDTTYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYY
 RGNTHYNSSLRSRVMTMSVDTSKNRFSKLVTSVTAADTAVYYCARLDPFDYWGRGTLVT
 VSSGGGGSGGGSGGGSSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKP
 GQAPVLVIYYDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHQVF
 GTGTKVTVLR (SEQ ID NO:5) (линкер GGGs×3 подчеркнут);

SBT01G - VHVL - линкер Whitlow 218 - pSB_0158

HLHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINDTTYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYY
 RGNTHYNSSLRSRVMTMSVDTSKNRFSKLVTSVTAADTAVYYCARLDPFDYWGRGTLVT
 VSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQ
 KPGQAPVLVIYYDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHQ
 VFGTGTKVTVLR (SEQ ID NO:6) (линкер Whitlow 218 подчеркнут);

SBT01G - VHVL - линкер AB pur - pSB_0159

HLHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINDTTYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYY
 RGNTHYNSSLRSRVMTMSVDTSKNRFSKLVTSVTAADTAVYYCARLDPFDYWGRGTLVT

VSSASSGGSTSGSGKPGSGEGSSGSARSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSV
 HWYQQKPGQAPVLYYYDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWD
 SSSDHQVFGTGTKVTVLR (SEQ ID NO:7) (линкер AB pur подчеркнут); или

последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентичность последовательности с вышеуказанными последовательностями, при условии, что мишень-связывающий домен связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении.

[0094] Например, линкер может содержать последовательность:

GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:20) линкер GGGs×3; или

GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:21) линкер Whitlow 218; или

ASSGGSTSGSGKPGSGEGSSGSAR (SEQ ID NO:22) линкер AB pur.

[0095] Необязательно, любая из вышеуказанных последовательностей может включать наборы CDR из VH- и VL- доменов, описанных выше.

С. Шарнирная область

[0096] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область раскрытых CAR может быть выбрана из внеклеточного домена CD8, CD4 или CD28, Fc-области IgG1 антитела или внеклеточного домена любого из TLR рецепторов, как известно специалистам в данной области техники, и их можно найти в базе данных GenBank.

[0097] Например, шарнирная область может содержать последовательность:

IEVMYPPPYLDNEKSNGTPIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP (SEQ ID NO:30) (CD28);

или

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTC
 GVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:15) (CD8); или

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентичность последовательности с вышеуказанными последовательностями шарнирной области.

D. Трансмембранный домен

[0098] Трансмембранный домен может содержать трансмембранный домен рецептора семейства иммуноглобулинов, такого как CD8. Внутриклеточный домен может быть выбран из любой трансмембранной молекулы на Т-клетке. Например, трансмембранный (TM) домен раскрытого CAR может содержать TM-домен CD2, CD3, CD16, CD32, CD64, CD28, CD247, 4-1BBL, CD4 или CD8.

[0099] Например, трансмембранный домен может содержать последовательность:

FWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:16); или

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:17); или

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентичность последовательности с вышеуказанными последовательностями шарнирной области.

E. Домен сигнальной трансдукции

1. Домен сигнальной трансдукции CD3ξ

[0100] В некоторых вариантах осуществления домен сигнальной трансдукции содержит сигнальный домен CD3 ξ . Сигнальный домен CD3 ξ раскрытой молекулы CAR может содержать аминокислотную последовательность CD3 ξ , например, домен сигнальной трансдукции CD3-дзета.

[0101] Например, домен сигнальной трансдукции CD3 ξ может содержать последовательность:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRK
NPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
(SEQ ID NO:19); или

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентичность последовательности с вышеуказанной последовательностью домена сигнальной трансдукции CD3-дзета.

[0102] Например, домен сигнальной трансдукции CD3-дзета может включать аминокислоты 21-163, 31-142, 68-89 и/или 138-158 последовательности, показанной в SEQ ID NO:19, или их функциональные варианты (например, с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 10-20 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями).

2. Домен сигнальной трансдукции Fc-рецептора

[0103] В некоторых вариантах осуществления домен сигнальной трансдукции содержит сигнальный Fc-домен. Сигнальный Fc-домен может представлять собой любой из Fc-альфа-, Fc-гамма-, Fc-эпсилон-, Fc-мю- и Fc-дельта-рецепторов. Например, сигнальный домен Fc-рецептора может содержать аминокислоты, участвующие во взаимодействии с Src (например, Fgr, Fyn, Hck, Lyn, Yes и Src) и киназами семейства ZAP-70, например, один или более доменов ITAM (см., например, Sanchez-Mejorada et al. (1998) J. Leukocyte Biol., 63:531; Garcia-Garcia et al. (2002) J. Leukocyte Biol., 72:1092). В некоторых вариантах осуществления домен сигнальной трансдукции Fc-рецептора включает по меньшей мере один домен ITAM, например, из любого из Fc-альфа-, Fc-гамма-, Fc-эпсилон-, Fc-мю- и Fc-дельта-рецепторов, или по существу идентичный им.

Последовательности также можно найти следующим образом:

Молекула	Номер в GenBank
CD3 ξ	NP_000725.1
Семейство Fc-гамма-рецепторов (CD16)	NP_000560.5 NP_001231682.1
Семейство Fc-гамма-рецепторов (CD32)	AAH20823.1 AAH19931.1 AAI48274.1 AAI37398.1
Семейство Fc-гамма-рецепторов (CD64)	AAI60240.1

	AAH32634.1
	AAI56865.1

Ф. Костимулирующий домен

[0105] CAR по настоящему изобретению могут включать один или более костимулирующих доменов в дополнение к домену сигнальной трансдукции CD3 ξ или Fc-рецептору. Костимулирующие домены могут происходить, например, из CD28, 4-1BB, CD2, CD27, CD30, OX40, CD40, PD-1, PD-L1, PD-L2, ICOS, LFA-1, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83L, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-H3, B7-H4 и другие. Конструкции CAR могут содержать два или более костимулирующих сигнальных домена (например, CD28 и 4-1BB).

[0106] Костимулирующий домен или домены могут располагаться между доменом сигнальной трансдукции и трансмембранной областью.

[0107] В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 может содержать последовательность:

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:29);

или

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентичность последовательности с вышеуказанной последовательностью.

[0108] В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен 41BB может содержать последовательность:

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:28);

или

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% идентичность последовательности с вышеуказанной последовательностью.

III. Нуклеиновые кислоты

A. Нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR

[0109] В настоящем изобретении раскрыты молекулы нуклеиновой кислоты (полинуклеотиды), содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует CAR по настоящему изобретению. Нуклеиновая кислота раскрытого CAR может находиться в форме ДНК или в форме РНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК; и может быть двухцепочечной или одноцепочечной, и если она является одноцепочечной, то это может быть кодирующая цепь или не кодирующая (антисмысловая) цепь. РНК включает мРНК, siРНК, sРНК, ssРНК и так далее.

[0110] Например, нуклеиновые кислоты могут содержать нуклеотидные последовательности, которые кодируют полипептиды с любой из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие VH-домены, содержат:

(1) SBT01 BX (M)

CACCTGCACTTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTTGTGAAGCCTTCGGAGACCC
TGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAACGATAACCACTTACTACTGGG
GCTGGATTCCGAGCCCCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTAC

CGGGGGAACACCCACTACAATTCGTCCCTGAGGAGTCGCGTCACCATGTCTGTTCGAC
 ACTTCCAAGAACCGATTCTCCCTGAAGGTCACTTCTGTGACTGCCGCAGACACGGCT
 GTCTATTACTGTGCGAGACTCGACCCATTTGACTACTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTC
 ACTGTCTCGAGC (SEQ ID NO:8),

(2) SBT01 VH (G)

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCC
 TGTCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTACTACTGGG
 GCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTAT
 AGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGA
 CACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCAGACACGG
 CTGTGTATTACTGTGCGAGACTCGACCCATTTGACTACTGGGGCCGTGGCACCCCTGG
 TCACTGTCTCGAGC (SEQ ID NO:9); или

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%,
 99% или 99,5% идентичность последовательности с вышеуказанными
 последовательностями.

[0111] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности,
 кодирующие VL-домены, содержат:

(1) SBT01 VL (M)

TCSTATGTCCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCGCTGGCCCCGGGAGAGACGG
 CCACAATTAATTGTGGTGGAGACGACATTGAAAATCAAATGTCAACTGGTATCAG
 CAGAAGTCAGGTCAGGCCCTATGCTGCTCATCTTCTTTGATACCAGACGGCCCTCA
 GGGATCCCGGAGCGATTCTCTGGCTCCAGGTCTGAGGACACGGCCAACCTGACCAT
 CACCAGGGTCGAGGCCGGGGATGACGCCGACTATTTCTGTCAGGTGTATGATAGGA
 AACTGATCACCAAGTCTTCGGACCTGGGACCACGGTCACCGTCCTA (SEQ ID
 NO:10);

(2) SBT01 VL (G)

TCSTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGG
 CCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAG
 CAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATTATGATAGCGACCGGCCCTCA
 GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATC
 AGCAGGGTTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTAAGTGTGTCAGGTGTGGGACAGTAG
 TAGTGATCACCAAGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA (SEQ ID NO:11);

или

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%,
 99% или 99,5% идентичность последовательности с вышеуказанными
 последовательностями.

[0112] В еще одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты,
 кодирующая VH-домены, содержит SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9. В некоторых
 вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая VH-домены,
 содержит нуклеиновую последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%,

95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:9 при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении.

[0113] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая VL-домены, содержит SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая VL-домены, содержит нуклеиновую последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении.

[0114] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая фрагмент scFV, содержит SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая scFV, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO:10, при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении.

[0115] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая фрагмент scFV, содержит SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая scFV, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 11, при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении.

[0116] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая фрагмент scFV, содержит SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая scFV, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении.

[0117] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая фрагмент scFV, содержит SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая scFV, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11, при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении.

[0118] В еще одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует молекулу scFv и имеет нуклеотидную последовательность:

SBT01G - VHVL - линкер GGS×3 - pSB_0149

CACCTGCACTTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTTGTGAAGCCTTCGGAGACCC
 TGTCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAACGATACTTACTACTGGG
 GCTGGATTCCGAGCCCCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTAC
 CGGGGGAACACCCACTACAATTCGTCCCTGAGGAGTCGCGTCACCATGTCTGTGCAC
 ACTTCCAAGAACCGATTCTCCCTGAAGGTCACTTCTGTGACTGCCGCAGACACGGCT
 GTCTATTACTGTGCGAGACTCGACCCATTTGACTACTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTC
 ACTGTCTCGAGCGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGG
ATCTTCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTGAGTGGCCCCAGGAAAGACGGC
 CAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGC
 AGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATTATGATAGCGACCGGCCCTCAG
 GGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCA
 GCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGACAGTAGT
 AGTGATCACCAAGTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTCACCGTCCTACGC (SEQ ID
 NO:12) (линкер GGS×3 подчеркнут); или

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%,
 99% или 99,5% идентичность последовательности с вышеуказанной последовательностью.

[0119] В еще одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты
 кодирует молекулу scFv и имеет нуклеотидную последовательность:

SBT01G - VHVL - линкер Whitlow 218 - pSB_0158

CACCTGCACTTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTTGTGAAGCCTTCGGAGACCC
 TGTCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAACGATACTTACTACTGGG
 GCTGGATTCCGAGCCCCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTAC
 CGGGGGAACACCCACTACAATTCGTCCCTGAGGAGTCGCGTCACCATGTCTGTGCAC
 ACTTCCAAGAACCGATTCTCCCTGAAGGTCACTTCTGTGACTGCCGCAGACACGGCT
 GTCTATTACTGTGCGAGACTCGACCCATTTGACTACTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTC
 ACTGTCTCGAGCGGAAGCACGAGTGGTTCAGGCAAACCGGGTTCGGTGAAGG
TTCAACAAAAGGTTCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTGAGTGGCCCCAG
 GAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCAC
 TGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATTATGATAGCGAC
 CGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACC
 CTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTG
 GGACAGTAGTAGTGATCACCAAGTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAC
 GC (SEQ ID NO:13) (линкер Whitlow 218 подчеркнут); или

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%,
 99% или 99,5% идентичность последовательности с вышеуказанной последовательностью.

[0120] В еще одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты
 кодирует молекулу scFv и имеет нуклеотидную последовательность:

SBT01G - VHVL - линкер AB pur - pSB_0159

CACCTGCACTTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTTGTGAAGCCTTCGGAGACCC

TGTCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAACGATAACCACTTACTACTGGG
 GCTGGATTCCGAGCCCCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTAC
 CGGGGGAACACCCACTACAATTCGTCCCTGAGGAGTCGCGTCACCATGTCTGTGAC
 ACTTCCAAGAACCGATTCTCCCTGAAGGTCACCTTCTGTGACTGCCGCAGACACGGCT
 GTCTATTACTGTGCGAGACTCGACCCATTTGACTACTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTC
 ACTGTCTCGAGCGCCTCTAGCGGGGGGAGCACATCAGGAAGCGGCAAGCCCCG
TAGCGGCGAAGGCTCCTCTGGCAGCGCCCCGCTCCTATGTGCTGACTCAGCCACCC
 TCAGTGTGAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACAT
 TGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGG
 TCATCTATTATGATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCA
 ACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTTCGAAGCCGGGGATGAGGCC
 GACTATTACTGTCAGGTGTGGGACAGTAGTAGTGATCACCAAGTCTTCGGAAGTGGG
 ACCAAGGTCACCGTCCTACGC (SEQ ID NO:14) (линкер АВ пуг подчеркнут); или

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%,
 99% или 99,5% идентичность последовательности с вышеуказанными
 последовательностями.

[0121] Необязательно, они могут включать последовательности, кодирующие
 наборы CDR из VH- и VL-доменов, описанных в настоящем изобретении.

[0122] Варианты полинуклеотидов могут содержать изменения в кодирующих
 областях, некодирующих областях или в обеих. В некоторых вариантах осуществления
 варианты полинуклеотида содержат изменения, которые вызывают «молчание» замены,
 добавления или делеции, но не изменяют свойства или активности кодированного
 полипептида CAR. В некоторых вариантах осуществления варианты полинуклеотида
 содержат изменения, которые не приводят к каким-либо изменениям в аминокислотной
 последовательности. В некоторых вариантах осуществления варианты полинуклеотида
 содержат «молчание» замены за счет вырожденности генетического кода. Варианты
 полинуклеотидов могут быть получены по разным причинам, например, для кодон-
 оптимизации экспрессии для конкретного хозяина.

[0123] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, описанные в
 настоящем изобретении, являются выделенными.

[0124] Полинуклеотиды, кодирующие CAR, представляют собой изолированные
 молекулы или могут быть включены в вектор, такой как плазмида, космида, искусственная
 хромосома или вирус. Такие векторы можно использовать для трансфекции клеток-
 мишеней.

В. Экспрессионные конструкции и векторы

[0125] Полинуклеотиды, кодирующие CAR по настоящему изобретению, могут
 включать регуляторные элементы, операбельно связанные с нуклеотидной
 последовательностью, кодирующей CAR. Например, полинуклеотид может включать один
 или более элементов, регулирующих транскрипцию, таких как промоторы или энхансеры,
 которые, когда полинуклеотид находится в клетке, индуцируют экспрессию

последовательности, кодирующей CAR, в клетке.

[0126] Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем изобретении, могут быть включены в векторы, способные трансфектировать клетки. Такие векторы включают, помимо прочего, вирусные векторы, плазмиды и микровезикулы, например, липосомы. Иллюстративными вирусными векторами являются аденовирусные векторы Ad, AAV, лентивирусные векторы и векторы на основе вируса везикулярного стоматита (VSV) и ретровирусы. Лентивирусы представляют собой род семейства *Retroviridae* и включают ВИЧ, SIV и FIV. Лентивирусы могут доставлять большие количества генетического материала в ДНК клетки-хозяина. Они способны инфицировать неделящиеся клетки.

IV. Клетки

[0127] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка (хозяин), содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую раскрытый CAR, где молекула нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать контрольную последовательность экспрессии, операбельно связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CAR. Собранный CAR (путем синтеза, сайт-направленного мутагенеза или другого метода, известного специалистам в данной области), молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая раскрытый CAR, может быть вставлена в экспрессионный вектор и операбельно связана с контрольной последовательностью экспрессии, подходит для экспрессии раскрытого CAR в желаемом хозяине. Правильную сборку можно подтвердить секвенированием нуклеотидной последовательности, рестрикционным картированием и/или экспрессией полипептида CAR в подходящем хозяине. Как хорошо известно в данной области, для получения высоких уровней экспрессии трансфектированного гена в хозяине этот ген должен быть оперативно связан с контрольными последовательностями транскрипционной и трансляционной экспрессии, которые являются функциональными в выбранном экспрессирующем хозяине.

[0128] Настоящее изобретение также относится к клеткам (например, рекомбинантным клеткам), содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR и/или экспрессирующие CAR.

[0129] Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая раскрытый CAR, может быть доставлена в клетку-хозяин, включающую, помимо прочего, Т-клетку, В-клетку, миелоидный предшественник, макрофаг и т.д., с помощью плазмиды или вирусного вектора, как известно специалистам в данной области. Полученная рекомбинантная клетка (хозяин) может включать, помимо прочего, Т-клетку, CD4 Т-клетку, Treg-клетку, CD8 альфа Т-клетку, CD8 бета Т-клетку, хелперную Т-клетку, гранулоциты (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы), мегакариоциты, моноциты, макрофаги и дендритные клетки, стволовые Т-клетки памяти, а также клетки, экспрессирующие молекулы МНС класса I или класса II, как известно специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка (хозяин), содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую раскрытый CAR, может представлять собой миелоидную клетку-предшественник, выбранную из группы, состоящей из общего миелоидного

предшественника, гранулоцитарно-макрофагального предшественника, мегакариоцитарно-эритроидного предшественника, гранулоцитарного предшественника и моноцитарного предшественника, как известно специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления миелоидная клетка представляет собой аутологичную или аллогенную клетку.

[0130] В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, представляют собой Treg-клетки. «Регуляторные Т-клетки» или «Treg-клетки» представляют собой клетки, относящиеся к специализированной субпопуляции Т-клеток, которые подавляют иммунный ответ, тем самым поддерживая гомеостаз и аутоотолерантность. Treg способны ингибировать пролиферацию Т-клеток и выработку цитокинов и играть решающую роль в предотвращении аутоиммунитета. Treg характеризуется экспрессией FoxP3. Поверхностные маркеры Treg включают CD4, CD25^{high} (высокая молекулярная плотность) и CD127^{low} (низкая молекулярная плотность). Мышиные и человеческие Treg экспрессируют GITR/AITR и CTLA-4. Человеческие CD4⁺FoxP3⁺ Treg-клетки можно разделить на три субпопуляции: (1) CD45RA⁺CD25⁺FoxP3^{low} покоящиеся Treg-клетки, (2) CD45RO⁺CD25^{high}FoxP3^{high} активированные Treg-клетки и (3) CD45RO⁺CD25⁺FoxP3^{low} несупрессивные эффекторные Т-клетки (Teff), продуцирующие провоспалительные цитокины.

[0131] Клетки, подлежащие трансформации нуклеиновыми кислотами, описанными в настоящем изобретении, могут представлять собой клетки, отобранные у субъекта, которому должны быть введены рекомбинантные клетки. Таким образом, можно ослабить проблемы аллогенного иммунного ответа.

[0132] Клетки можно экспандировать *ex vivo* перед введением субъекту.

[0133] Treg-клетки, в которые были включены нуклеиновые кислоты, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, могут экспрессировать эти CAR и использоваться в способах, описанных здесь, для лечения ревматоидного артрита.

[0134] Кроме того, белки, продуцированные трансформированным/рекомбинантным хозяином, можно очистить любым подходящим методом. Такие методы включают хроматографию (например, ионообменную, аффинную и эксклюзионную колоночную хроматографию), центрифугирование, метод дифференциальной растворимости или любой другой стандартный метод очистки белка. Аффинные метки, такие как гексагистидин, мальтозосвязывающий домен, последовательность белка оболочки вируса гриппа и глутатион-S-трансфераза, могут быть присоединены к белку, для обеспечения легкой очистки путем пропускания через соответствующую аффинную колонку. В некоторых вариантах осуществления белки также можно физически охарактеризовать с использованием таких методов, как протеолиз, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), ядерный магнитный резонанс и рентгеновская кристаллография.

Композиции

[0135] В настоящем изобретении также раскрыты фармацевтические композиции,

содержащие рекомбинантную клетку, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую раскрытый полипептид CAR и/или экспрессирующую раскрытый полипептид CAR, и фармацевтически приемлемый носитель, а также способы применения в лечении ревматоидного артрита.

[0136] В настоящем изобретении термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, содержащей фармацевтическое соединение (например, лекарственное средство или рекомбинантную Treg-клетку, как описано в настоящем изобретении), и фармацевтически приемлемый носитель.

[0137] В рамках настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый» относится к носителю, который совместим с другими ингредиентами фармацевтической композиции, и который можно безопасно вводить субъекту. Этот термин используется в качестве синонима «физиологически приемлемый» и «фармакологически приемлемый». Фармацевтические композиции и способы их получения и применения известны специалистам в данной области техники в свете настоящего изобретения. Подробный список подходящих фармакологических композиций и способов их введения можно найти в таких источниках, как Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985; Brunton et al., «Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics», McGraw-Hill, 2005; University of the Sciences in Philadelphia (eds.), «Remington: The Science and Practice of Pharmacy», Lippincott Williams & Wilkins, 2005; and University of the Sciences in Philadelphia (eds.), «Remington: The Principles of Pharmacy Practice», Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

[0138] Фармацевтически приемлемые носители, как правило, должны быть стерильными по меньшей мере для использования человеку. Фармацевтическая композиция обычно содержит агенты для буферизации и консервации при хранении и может включать буферы и носители для соответствующей доставки, в зависимости от пути введения. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, помимо прочего, нормальный (0,9%) физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS), сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS) и растворы нескольких электролитов, такие как PlasmaLyte ATM (Baxter).

[0139] Фармацевтические композиции могут быть составлены для любого пути введения, включая мукозальный (например, назальный, сублингвальный, вагинальный, буккальный или ректальный), парентеральный (например, подкожную, внутривенную, внутримышечную или внутриартериальную инъекцию, болюсную или инфузионную), пероральный или чрескожный.

[0140] Инъекционные (например, для внутривенного введения) композиции могут содержать раствор композиции, суспендированный в приемлемом носителе, таком как водный носитель. Можно использовать любой из многочисленных водных носителей, например, воду, забуференную воду, 0,4% солевой раствор, 0,9% изотонический физиологический раствор, 0,3% глицин, 5% декстрозу и т.п., и они могут включать гликопротеины для повышенной стабильности, такие как альбумин, липопротеин, глобулин и т. д. Часто используется нормальный забуференный физиологический раствор

(135-150 mM NaCl). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты для регулирования pH и буферные агенты, агенты для регулирования тоничности, смачивающие агенты, например, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, монолаурат сорбитана, триэтаноламина олеат и т.д. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть составлена в виде набора для внутривенного введения.

[0141] Составы, подходящие для парентерального введения, например, такого как внутрисуставное (в суставы), внутривенное, внутримышечное, интратуморальное, внутрикожное, внутрибрюшинное и подкожное введение, включают водные и неводные изотонические стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают состав изотоничным по отношению к крови предполагаемого реципиента, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Растворы и суспензии для инъекций также можно приготовить из стерильных порошков, гранул и таблеток. В практике настоящего изобретения композиции можно вводить, например, внутривенной инфузией, местно, внутрибрюшинно, внутривезикулярно или интратекально. Составы композиций могут быть представлены в герметичных контейнерах для единичных или нескольких доз, таких как ампулы и флаконы.

[0142] Клетки можно криоконсервировать. Криоконсервация может включать в себя приготовление клеток с использованием агента для криоконсервации, такого как ДМСО. Коммерчески доступные среды включают, например, CryoStor® и pZerve®, доступные от Millipore Sigma.

[0143] Композиции можно составлять в виде лекарственных форм для введения. Термин «лекарственная форма» относится к конкретному формату фармацевтического препарата и зависит от пути введения. Примеры лекарственных форм включают, помимо прочего: дисперсии; суппозитории; мази; катаплазмы (припарки); пасты; порошки; повязки; кремы; пластыри; растворы; патчи; аэрозоли (например, назальные спреи или ингаляторы); гели; жидкие лекарственные формы, подходящие для перорального или мукозального введения пациенту, включая суспензии (например, водные или неводные жидкие суспензии, эмульсии масло в воде или жидкие эмульсии вода в масле), растворы и эликсиры; жидкие лекарственные формы, подходящие для парентерального введения пациенту; и стерильные твердые вещества (например, кристаллические или аморфные твердые вещества), которые можно восстановить для получения жидких лекарственных форм, подходящих для парентерального введения пациенту.

[0144] Термины «доза» и «дозировка» используются здесь взаимозаменяемо. Доза относится к количеству активного ингредиента, вводимому субъекту при каждом введении. Доза будет варьироваться в зависимости от ряда факторов, включая частоту введения; размер и толерантность субъекта; тяжесть патологического состояния; риск проявления

побочных эффектов; путь введения; и модальность визуализации детектируемой метки (если она присутствует). Специалистам в данной области должно быть понятно, что дозу можно изменить в зависимости от вышеуказанных факторов или на основе прогресса в лечении.

[0145] Фармацевтический препарат может быть упакован или приготовлен в виде разовой лекарственной формы. В такой форме препарат делится на разовые дозы, содержащие соответствующие количества активного компонента, например, в соответствии с дозой терапевтического агента или концентрацией композиции. Разовая лекарственная форма может представлять собой упакованный препарат, где упаковка содержит дискретные количества препарата. Композиция, при желании, также может содержать другие совместимые терапевтические средства.

[0146] В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат рекомбинантную клетку, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CAR, содержащий определяющие комплементарность участки (CDR) из VH-доменов с SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат рекомбинантную клетку, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CAR, содержащий CDR из VL-доменов с SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат рекомбинантную клетку, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CAR, содержащий CDR из VH- и VL- доменов с SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат рекомбинантную клетку, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CAR, содержащий CDR из VH- и VL-доменов с SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат рекомбинантную клетку, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CAR, содержащий CDR из VH- и VL-доменов SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат рекомбинантную клетку, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CAR, содержащий CDR из VH- и VL-доменов с SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой T-клетку, CD4 T-клетку, Treg-клетку, CD8 альфа T-клетку, CD8 бета T-клетку, хелперную T-клетку, гранулоцит (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы), мегакариоциты, моноциты, макрофаг и дендритную клетку или стволовую T-клетку памяти. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Treg-клетку.

[0147] В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат рекомбинантную клетку, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CAR, содержащий CDR из VH- и VL-доменов с SEQ ID NO:1 (SBT01 VH (M)) и SEQ ID NO:4 (SBT01 VH (G)). В некоторых вариантах осуществления VH-домен полипептида CAR содержит VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID

NO:34, и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и VL-домен полипептида CAR содержит VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой T-клетку, CD4 T-клетку, Treg-клетку, CD8 альфа T-клетку, CD8 бета T-клетку, хелперную T-клетку, гранулоцит (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы), мегакарициты, моноциты, макрофаг и дендритную клетку или стволовую T-клетку памяти. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Treg-клетку.

[0148] В еще одном варианте осуществления композиции по изобретению содержат рекомбинантную клетку, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CAR, содержащий scFV, содержащий один или более VH-доменов, содержащих аминокислотную последовательность VH-доменов с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид CAR, содержит scFV, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой T-клетку, CD4 T-клетку, Treg-клетку, CD8 альфа T-клетку, CD8 бета T-клетку, хелперную T-клетку, гранулоцит (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы), мегакарициты, моноциты, макрофаг и дендритную клетку или стволовую T-клетку памяти. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Treg-клетку.

[0149] В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат рекомбинантную клетку, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CAR, содержащий scFV, содержащий VL-домены с SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид CAR, содержит scFV, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой T-клетку, CD4 T-клетку, Treg-клетку, CD8 альфа T-клетку, CD8 бета T-клетку, хелперную T-клетку, гранулоцит (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы), мегакарициты, моноциты, макрофаг и дендритную клетку или стволовую T-клетку памяти. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Treg-клетку.

[0150] В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат рекомбинантную клетку, имеющую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CAR, содержащий scFV, содержащий VH- и VL-домены с SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид CAR, содержит scFV, содержащий аминокислотную

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, CD4 Т-клетку, Treg-клетку, CD8 альфа Т-клетку, CD8 бета Т-клетку, хелперную Т-клетку, гранулоцит (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы), мегакариоциты, моноциты, макрофаг и дендритную клетку или стволовую Т-клетку памяти. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Treg-клетку.

[0151] В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат рекомбинантную клетку, имеющую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CAR, содержащий scFV, содержащий VH- и VL-домены с SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид CAR, содержит scFV, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 4, при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, CD4 Т-клетку, Treg-клетку, CD8 альфа Т-клетку, CD8 бета Т-клетку, хелперную Т-клетку, гранулоцит (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы), мегакариоциты, моноциты, макрофаг и дендритную клетку или стволовую Т-клетку памяти. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Treg-клетку.

[0152] В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат рекомбинантную клетку, имеющую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CAR, содержащий scFV, содержащий VH- и VL-домены с SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид CAR, содержит scFV, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 99,5% SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, CD4 Т-клетку, Treg-клетку, CD8 альфа Т-клетку, CD8 бета Т-клетку, хелперную Т-клетку, гранулоцит (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы), мегакариоциты, моноциты, макрофаг и дендритную клетку или стволовую Т-клетку памяти. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Treg-клетку.

[0153] В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат рекомбинантную клетку, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CAR, содержащий scFV, содержащий VH- и VL-домены с SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид CAR, содержит scFV, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или

99,5% SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4, при условии, что фрагмент scFV связывается с цитруллинированным антигеном, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, CD4 Т-клетку, Treg-клетку, CD8 альфа Т-клетку, CD8 бета Т-клетку, хелперную Т-клетку, гранулоцит (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы), мегакариоциты, моноциты, макрофаг и дендритную клетку или стволовую Т-клетку памяти. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Treg-клетку.

VI. Способы применения

[0154] Т-клетки и, в частности, Treg-клетки, которые экспрессируют описанные здесь CAR, пригодны в лечении ревматоидного артрита. Способы применения включают введение эффективного количества фармацевтической композиции по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом, например, субъекту, страдающему ревматоидным артритом.

[0155] В рамках настоящего изобретения, термин «субъект» относится к отдельному животному. Термин «пациент», используемый в настоящем изобретении, относится к субъекту, находящемуся под присмотром или наблюдением поставщика медицинских услуг, такого как врач или медсестра. Субъекты включают млекопитающих, таких как люди и приматы, отличные от человека, такие как обезьяны, а также собаки, кошки, лошади, крупный рогатый скот, кролики, крысы, мыши, козы, свиньи и другие виды млекопитающих. Субъекты также могут включать птиц. Пациентом может быть субъект, который желает лечения, мониторинга, корректировки или модификации существующего терапевтического режима и т.д. Термин «субъект с ревматоидным артритом» относится к субъекту, у которого был диагностирован ревматоидный артрит. К пациентам с ревматоидным артритом могут относиться субъекты, которые не получали лечения, получают лечение в настоящее время, прошли лечение и прекратили лечение.

[0156] Как здесь используются, термины «эффективное количество», «эффективная доза» и «терапевтически эффективное количество» относятся к количеству агента, которое является достаточным для обеспечения желаемого ответа, такого как ослабление или устранение признака или симптома заболевания или облегчение расстройства. В некоторых примерах «эффективное количество» представляет собой такое количество, которое обеспечивает лечение (включая профилактику) одного или более симптомов и/или основных причин любого расстройства или заболевания, и/или предотвращает прогрессирование заболевания. Например, для данного параметра терапевтически эффективное количество будет демонстрировать увеличение или уменьшение терапевтического эффекта по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% или по меньшей мере 100%. Терапевтическая эффективность также может быть выражена в виде «кратного» увеличения или уменьшения. Например, терапевтически эффективное количество может иметь эффект, который по меньшей мере в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 5 раз или выше по сравнению с контролем.

[0157] Фармацевтическую композицию можно вводить любым подходящим путем,

включая, помимо прочего, внутривенный, подкожный, внутримышечный или внутрибрюшинный пути. Пример применения фармацевтической композиции включает хранение композиции в концентрации 10 мг/мл в стерильном изотоническом солевом растворе для инъекций при температуре 4°C и ее разведение либо в 100 мл, либо в 200 мл 0,9% хлорида натрия для инъекций перед введением пациенту. Фармацевтическую композицию вводят внутривенной инфузией в течение 1 ч в дозе от 0,2 до 10 мг/кг. В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенной инфузией в течение периода от 15 мин до 2 ч. В других вариантах осуществления процедура введения осуществляется подкожной болюсной инъекцией.

[0158] Дозу композиции выбирают таким образом, чтобы обеспечить эффективную терапию пациента, и дозы находятся в диапазоне от менее 0,1 мг/кг массы тела до приблизительно 25 мг/кг массы тела или в диапазоне 1 мг-2 г на пациента. В некоторых случаях доза находится в диапазоне 1-100 мг/кг или приблизительно 50-8000 мг/пациента. Дозу можно повторять с соответствующей частотой, которая может находиться в диапазоне от одного раза в сутки до одного раза в три месяца, в зависимости от фармакокинетики композиции (например, периода полувыведения композиции из кровотока) и фармакодинамического ответа (например, продолжительность терапевтического эффекта композиции). В некоторых вариантах осуществления период полувыведения *in vivo* составляет от приблизительно 7 до приблизительно 25 суток, и введение композиции повторяют от одного раза в неделю до одного раза в 3 месяца.

[0159] Введение может быть периодическим. В зависимости от пути введения дозу можно вводить, например, один раз каждые 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 или 28 суток или более (например, один раз в 2, 3, 4 или 6 месяцев). В некоторых случаях введение повторяют чаще, например, 2 или 3 раза в сутки. За пациентом можно наблюдать, чтобы корректировать дозировку и частоту введения в зависимости от прогресса в лечении и любых неблагоприятных побочных эффектов, как должно быть понятно специалистам в данной области.

[0160] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления дополнительное введение зависит от прогресса в состоянии пациента, например, за пациентом наблюдают между введениями. Например, после первого введения или цикла введений за пациентом можно наблюдать в отношении скорости роста опухоли, рецидива (например, в случае послеоперационного пациента) или общих симптомов, связанных с заболеванием, таких как слабость, боль, тошнота и т. д.

[0161] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, описанные здесь, вводят в синовиальную оболочку суставов субъектов, страдающих ревматоидным артритом. Такое введение может осуществляться инъекцией непосредственно в сустав.

[0162] Типичный способ по настоящему изобретению включает выделение Т-лимфоцитов из биологического образца, полученного от субъекта. Такие Т-клетки можно выделить иммуноаффинным методом, например, с использованием дериватизированных твердых подложек и анти-CD4 антител. CD4+ Т-регуляторные клетки (Treg) можно

отделить от не-Treg-клеток на основе их маркерного профиля. Treg-клетки представляют собой CD4+, CD25+, CD127lo. Не-Treg-клетками являются: CD4+, CD25+ и CD127+. Выделенные Treg-клетки затем трансфектируют экспрессионным вектором, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) по настоящему изобретению. Трансфектированные клетки экспандируют. Экспандированные клетки вводят субъекту.

Наборы

[0163] В рамках настоящего изобретения термин «набор» относится к набору предметов, предназначенных для совместного применения. Набор может необязательно включать референтный агент и/или инструкции по его применению. Набор может дополнительно включать контейнер для транспортировки, адаптированный для хранения контейнера, такого как флакон, который содержит композицию, раскрытую здесь. Набор может включать в себя контейнер, содержащий набор предметов.

[0164] Наборы по настоящему изобретению могут содержать фармацевтическую композицию, описанную в настоящем изобретении, содержащуюся в контейнере, таком как мешок или флакон, для внутривенного введения. В набор также может быть включена пластиковая трубка для жидкости, например пластиковая трубка, с капельной камерой. Капельная камера может сообщаться через трубку для жидкости с иглой для внутривенного введения. Трубка для жидкости также может содержать один или более Y-образных портов и роликовый зажим.

Примеры

[0165] Сокращения: CAR (химерный антигенный рецептор); CF (цитруллинированный фибриноген); CFSE (сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина); CV (цитруллинированный виментин); EGFR (рецептор эпидермального фактора роста); ИН (интраназально); IV (внутривенно); ЛПС (липополисахарид); PAD2 (пептидиларгининдеиминаза 2); РВМС (моноклеарные клетки периферической крови); PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор); РА (ревматоидный артрит); scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент); СЖ (синовиальная жидкость); Teff (эффекторная Т-клетка); Treg (регуляторная Т-клетки); и UTD (нетрансдуцированный).

Пример 1: SBT01G стабильно функционирует так же хорошо или превосходит BVCA1 в люциферазной системе

[0166] Трансдукция Jurkat-FF-люцифераза - 50000 клеток на лунку высевали в каждый из 2 плоскодонных 96-луночных планшетов в RPMI с 2× сульфатом протамина. Вирусы разводили в RPMI таким образом, чтобы 100 мкл имели приблизительное значение MOI, равное 1. Затем в один ряд в каждом 96-луночном планшете добавляли по 100 мкл. Затем планшеты центрифугировали и помещали в инкубатор. На следующие сутки образцы объединяли. Трансдуцированные клетки ресуспендировали в среде и переносили по 100 мкл в планшет с U-образным дном в двух повторах. Клетки окрашивали CV-AF488 и CV-AF647 с анти-EGFR-PE в соотношении 1:100 при 4°C в течение 20 мин, промывали один раз, затем анализировали с использованием Novocyte. Затем образцы помещали в 6-

луночные планшеты, добавляя 3 мл свежей среды.

[0167] Нанесение покрытия на планшет - цитруллинированный виментин (CV) сначала разводили 1:100 в 4 мл PBS. Готовили 5 серийных 4-кратных разведений путем переноса 1 мл в 3 мл. Затем 100 мкл добавляли в 96-луночные планшеты. Планшеты помещали на ночь при температуре 4°C для покрытия.

[0168] Люциферазный анализ - нормализованные трансдуцированные клетки центрифугировали и ресуспендировали в 1 мл RPMI. Планшеты с CV-покрытием трижды промывали PBS. В планшеты добавляли по 50 мкл клеток. Добавляли 25 мкл 3× PMA/Iono и планшеты помещали в инкубатор при 37°C. Приблизительно через 24 ч планшеты с люциферазой анализировали, добавив 75 мкл реагента BioGlo, инкубируя 2-3 мин в темноте и считывая планшет.

[0169] На фиг. 1 показана ответная реакция трансдуцированных вирусом клеток Jurkat-FF-люцифераза на различные концентрации полноразмерного CV в покрытых им планшетах. Результаты показывают, что BVCA1 и STB01 имели самый сильный отклик на полноразмерный CV, связанный с планшетом.

[0170] На фиг. 2 показана ответная реакция трансдуцированных вирусом клеток Jurkat-FF-люцифераза на различные концентрации растворимого CV. Результаты показывают, что только BVCA1 и SBT01G-HL имели дозозависимый отклик на растворимый полноразмерный CV.

[0171] На фиг. 3 показано, что в анализе с растворимым пептидом, связанным с частицами, BVCA1 и SBT01 продемонстрировали специфичность связывания с CV.

[0172] На фиг. 4 показана ответная реакция BVCA1 и SBT01G на CV, связанный с планшетом, CV, захваченный антителом (V9), и растворимый CV при различных концентрациях белка. Результаты показывают, что SBT01G имеет более сильный отклик на CV, связанный с планшетом, и на CV, захваченный антителом (V9), но не на растворимый CV, чем BVCA1.

Пример 2: SBT01 и BVCA1 реагируют на синовиальную жидкость пациентов с ревматоидным артритом

[0173] Трансдукция Jurkat-FF-люцифераза - 24×10^6 клеток Jurkat-FF-luc центрифугировали и ресуспендировали в 24 мл RPMI, содержащей сульфат протамина и вирус со значением MOI, равным 3, для экспрессии CAR pSB_0147, pSB-0149 и pSB0139. Клетки смешивали и 4 мл аликвотировали в каждую лунку 6-луночного планшета. Затем планшеты центрифугировали и помещали в инкубатор на ночь. Клетки центрифугировали и повторно высевали в RPMI объемом 25 мл в культуральные флаконы T75.

[0174] Стимуляция синовиальной жидкостью - трансдуцированные клетки центрифугировали, ресуспендировали в RPMI и помещали в лунки черно/белых планшетов. Образцы синовиальной жидкости (СЖ) от пациентов с РА размораживали, перемешивали и разводили в RPMI перед добавлением в планшеты, содержащие трансдуцированные клетки. Клетки культивировали с СЖ при 37°C.

[0175] Люциферазный анализ - Приблизительно через 24 ч в каждую лунку

добавляли по 75 мкл реагента BioGlo и планшеты инкубировали 2-3 мин в темноте. Затем люминесценцию анализировали на планшетном ридере.

[0176] Выделение Treg и культивирование ткани - первичные человеческие Treg-клетки получали от здоровых доноров, используя остатки из камеры для лейкоредукции или лейкопаки. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли центрифугированием в градиенте плотности с использованием Ficoll-Paque Plus. CD25+ клетки обогащали положительной селекцией. Затем Treg-клетки выделяли с использованием FACS гейтирования по CD4+CD25+CD127lo клеткам. После выделения клетки стимулировали с использованием набора CTS Dynabeads Treg Xpander (Gibco) в соотношении частиц к клеткам 1:1 и культивировали в среде RPMI с добавлением 10% FBS, заменимых аминокислот, пирувата натрия и бета-меркаптоэтанола с рекомбинантным человеческим IL-2 в концентрации 300 МЕ/мл при плотности 0,25-0,3 млн клеток/мл. На сутки 9 экспансии добавляли еще одну порцию частиц CTS Dynabeads Treg Xpander в соотношении частиц к клеткам 1:1.

[0177] Трансдукция первичных Treg - первичные Treg трансдуцировали конструкциями CV-CAR на вторые сутки экспансии посредством спин-окуляции в присутствии сульфата протамина.

[0178] Активация Treg - CV-CAR-экспрессирующие Treg-клетки культивировали *in vitro* с разведениями образцов синовиальной жидкости в диапазоне от 1:5 до 1:160. Активацию Treg оценивали измерением экспрессии CD71.

[0179] Проточная цитометрия и анализ FACS - активированные культуры собирали и центрифугировали при 300× g в течение 5 мин, и затем ресуспендировали в 1× буфере Flowstain (Invitrogen) с красителем для оценки жизнеспособности клеток (Invitrogen), анти-EGFR и окрашивающими антителами для поверхностного CD71. Treg-клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C, затем центрифугировали и промывали 1× буфером Flow stain. Окрашенные клетки фиксировали CytoFix (BD Biosciences), и затем анализировали проточной цитометрией.

[0180] На фиг. 5 показана ответная реакция SBT01G и BVCA1 на синовиальную жидкость пациентов с РА. Данные показывают, что SBT01G давал более сильные реакции, чем BVCA1, на синовиальную жидкость от нескольких пациентов с РА.

[0181] На фиг. 6 показано, что для образцов синовиальной жидкости от шведских пациентов с РА, которые вызывали ответную реакцию, SBT01G снова был сильнее, чем BVCA1.

[0182] На фиг. 7 показаны ответные реакции первичных Treg-клеток, трансдуцированных CV-CAR, на синовиальную жидкость от нескольких пациентов с РА. Первичные Treg-клетки, экспрессирующие SBT01G CAR, более чувствительны к синовиальной жидкости пациентов с РА, чем первичные Treg-клетки, экспрессирующие BVCA1 CAR.

Пример 3: ответная реакция SBT01 и BVCA1 на цитруллинированный фибриноген

[0183] Нанесение покрытия на планшет - цитруллинированный белок разводили в PBS и добавляли в лунки черно/белого изопланшета. Планшеты помещали на ночь при 4°C для покрытия лунок планшета.

[0184] Люциферазный анализ - стабильно трансдуцированные и нетрансдуцированные (UTD) клеточные линии Jurkat-FF-luc центрифугировали и ресуспендировали в RPMI, содержащей 10% FBS. Планшеты, покрытые цитруллинированным белком, трижды промывали PBS. В покрытые планшеты добавляли по 50000 клеток на лунку в 75 мкл. В каждую лунку добавляли 5 мкл 15× PMA/Iono в RPMI и планшеты помещали в инкубатор при 37°C. Приблизительно через 24 ч в каждую лунку добавляли по 75 мкл реагента BioGlo и планшеты инкубировали 2-3 мин в темноте. Затем люминесценцию анализировали на планшетном ридере.

[0185] Выделение Treg и культивирование ткани - первичные человеческие Treg-клетки получали от здоровых доноров, используя остатки из камеры для лейкоредукции или лейкопаки. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли центрифугированием в градиенте плотности с использованием Ficoll-Paque Plus. CD25+ клетки обогащали положительной селекцией. Затем Treg-клетки выделяли с использованием FACS гейтирования по CD4+CD25+CD127^{lo} клеткам, и Teff выделяли с использованием FACS гейтирования по CD4+CD25^{lo}CD127^{pos} клеткам. После выделения клетки стимулировали CTS Dynabeads Treg Xpander (Gibco) в соотношении частиц к клеткам 1:1 и культивировали в среде RPMI с добавлением 10% FBS, заменимых аминокислот, пирувата натрия и b-меркаптоэтанола с рекомбинантным человеческим IL-2 в концентрации 300 МЕ/мл при плотности 0,25-0,3 млн клеток/мл. На сутки 9 экспансии добавляли еще одну порцию частиц CTS Dynabeads Treg Xpander в соотношении частиц к клеткам 1:1.

[0186] Трансдукция первичных Treg и Teff - первичные Treg и Teff трансдуцировали конструкциями CD19-CAR или CV-CAR на вторые сутки экспансии посредством спин-окуляции в присутствии сульфата протамина.

[0187] Активация Treg - перед началом активации культуры, CAR, экспрессирующих Treg, и Teff, метили витальным красителем для оценки пролиферации CFSE. Treg-клетки, экспрессирующие CD19-CAR и CV-CAR, культивировали *in vitro* в планшете, покрытом цитруллинированным виментином (CV) или цитруллинированным фибриногеном (CF) в дозах от 30 нг/мл до 10 мкг/мл. Активацию Treg оценивали измерением процентного содержания пролиферирующих клеток и экспрессии CD71.

[0188] Проточная цитометрия и анализ FACS - активированные культуры собирали и центрифугировали при 300× g в течение 5 мин, и затем ресуспендировали в 1× буфере Flowstain (Invitrogen) с красителем для оценки жизнеспособности клеток (Invitrogen), анти-EGFR и окрашивающими антителами для поверхностного CD71. Treg инкубировали в течение 30 мин при 4°C, затем центрифугировали и промывали 1× буфером Flowstain. Окрашенные клетки фиксировали CytoFix (BD Biosciences), и затем анализировали проточной цитометрией.

[0189] На фиг. 8 показаны ответные реакции SBT01G и BVCA1 на связанные с планшетом полноразмерную пептидиларгининдеиминазу 2 (PAD2)-цитруллинированный фибриноген. Результаты показывают, что SBT01G, но не BVCA1, также способен реагировать на связанные с планшетом полноразмерную PAD2-цитруллинированный фибриноген.

[0190] На фиг. 9 показано, что SBT01G CAR, экспрессированный на Teff-клетках и Treg клетках, реагирует на цитруллинированный виментин (CV) и цитруллинированный фибриноген (CF). Напротив, BVCA1 CAR, экспрессированный на Teff-клетках и Treg-клетках, реагирует на CV, но не на СЖ.

[0191] Таким образом, на фиг. 1-9 показано, что SBT01G стабильно «работает» так же хорошо или превосходит BVCA1 во всех системах анализа.

Пример 4: CV CARs демонстрируют функциональные ответы при использовании разных промоторов и линкеров

[0192] Выделение Treg и культивирование ткани - первичные человеческие Treg-клетки получали от здоровых доноров, используя остатки из камеры для лейкоредукции или лейкопаки. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли центрифугированием в градиенте плотности с использованием Ficoll-Paque Plus. CD25+ клетки обогащали положительной селекцией. Затем Treg-клетки выделяли с использованием FACS гейтирования по CD4+CD25+CD127^{lo} клеткам. После выделения клетки стимулировали CTS Dynabeads Treg Xpander (Gibco) в соотношении частиц к клеткам 1:1 и культивировали в среде RPMI с добавлением 10% FBS, заменимых аминокислот, пирувата натрия и β -меркаптоэтанола с рекомбинантным человеческим IL-2 в концентрации 300 МЕ/мл при плотности 0,25-0,3 млн клеток/мл. На сутки 9 экспансии добавляли еще одну порцию частиц CTS Dynabeads Treg Xpander в соотношении частиц к клеткам 1:1.

[0193] Трансдукция первичных Treg - первичные Treg трансдуцировали конструкциями CV-CAR на вторые сутки экспансии посредством спин-окуляции в присутствии сульфата протамина.

[0194] Активация Treg - перед началом активации культур, CAR, экспрессирующие Treg, метили витальным красителем для оценки пролиферации CFSE. Treg-клетки, экспрессирующие CV-CAR, культивировали *in vitro* с захваченными частицами пептидом CV. Активацию Treg оценивали измерением процента пролиферирующих клеток.

[0195] Проточная цитометрия и FACS анализ активации - активированные культуры собирали и центрифугировали при 300× g в течение 5 мин, и затем ресуспендировали в 1× буфере Flowstain (Invitrogen) с красителем для оценки жизнеспособности клеток (Invitrogen) и окрашивающим антителом для поверхностного EGFR. Treg инкубировали в течение 30 мин при 4°C, затем центрифугировали и промывали 1× буфером Flowstain. Окрашенные клетки фиксировали CytoFix (BD Biosciences), и затем анализировали проточной цитометрией.

[0196] Проточная цитометрия и FACS-анализ фенотипа Treg - на сутки 14 экспансии

нетрансдуцированные (UTD) Treg, экспрессирующие CD19-CAR и CV-CAR, окрашивали на транскрипционные факторы FoxP3 и Helios. Клетки фиксировали и пермеабилizировали с использованием набора буферов для транскрипционных факторов eBiosciences FoxP3 (eBiosciences).

[0197] Период покоя Treg-культур - на сутки 14 экспансии Treg, экспрессирующие CD19-CAR и CV-CAR, собирали, удаляли из частиц с помощью магнита и помещали в культуру с 300 МЕ/мл IL-2 только при титре 0,5 млн клеток/мл.

[0198] Проточная цитометрия и FACS-анализ экспрессии CAR - Treg, экспрессирующие CD19-CAR и CV-CAR, на сутки 14 экспансии и после суток 2 или 5 покоя окрашивали витальным красителем для оценки жизнеспособности клеток (Invitrogen) и окрашивающим антителом для поверхностного EGFR. Экспрессию CV-CAR детектировали инкубацией клеток с 1 мкг/мл CV, и затем с FITC-меченным анти-виментин антителом (клон V9, Invitrogen).

[0199] Нанесение покрытия на планшеты - цитруллинированный виментин (CV) разводили в PBS и добавляли в лунки черно/белого изопланшета. Планшеты помещали на ночь при 4°C для покрытия лунок планшета.

[0200] Люциферазный анализ - стабильно трансдуцированные и нетрансдуцированные (UTD) клеточные линии Jurkat-FF-luc центрифугировали и ресуспендировали в RPMI, содержащей 10% FBS. Планшеты, покрытые цитруллинированным белком, трижды промывали PBS. В покрытые планшеты добавляли по 50000 клеток на лунку в 75 мкл. В каждую лунку добавляли 5 мкл 15× PMA/Iono в RPMI и планшеты помещали в инкубатор при 37°C. Приблизительно через 24 ч в каждую лунку добавляли по 75 мкл реагента BioGlo и планшеты инкубировали 2-3 мин в темноте. Затем люминесценцию анализировали на планшетном ридере.

[0201] На фиг. 10A показано, что промоторы EF1A и MND направляют экспрессию и функциональные ответы CV-CAR T-клеток на растворимый связанный с частицами цитруллинированный пептид (pCV). На фиг. 10B показано, что использование различных промоторов не меняет фенотип клеток CV-CAR Treg.

[0202] На фиг. 11 показано, что выбор линкера scFv практически не влияет на ответные реакции SBT01G CAR T-клеток на полноразмерный CV.

[0203] На фиг. 12A показано, что трансдукция вектором SBT01G CAR приводила к экспрессии CV-CAR в более высоком проценте клеток, чем трансдукция вектором BVCA1 CAR. На фиг. 12B показано, что клетки SBT01G CAR и BVCA1 CAR Treg имеют сходные профили FoxP3 и Helios.

[0204] Таким образом, на фиг. 10-12 показано, что SBT01G показал более высокий процент CAR-положительных Treg, и SBT01G показал более высокие уровни экспрессии CAR.

Пример 5: оценка активации CV-CAR Treg цитруллинированным виментином *in vitro*

[0205] Выделение Treg и культивирование ткани - первичные человеческие Treg-

клетки получали от здоровых доноров, используя остатки из камеры для лейкоредукции или лейкопаки. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли центрифугированием в градиенте плотности с использованием Ficoll-Paque Plus. CD25+ клетки обогащали положительной селекцией. Затем Treg-клетки выделяли с использованием FACS гейтирования по CD4+CD25+CD127lo клеткам. После выделения клетки стимулировали CTS Dynabeads Treg Xpander (Gibco) в соотношении частиц к клеткам 1:1 и культивировали в среде RPMI с добавлением 10% FBS, заменимых аминокислот, пирувата натрия и смеси пенициллина/стрептомицина с рекомбинантным человеческим IL-2 в концентрации 300 МЕ/мл при плотности 0,25-0,3 млн клеток/мл.

[0206] Активация Treg - нетрансдуцированные и CV-CAR-экспрессирующие Treg-клетки культивировали *in vitro* с цитруллинированным антигеном виментином в дозах от 10 нг/мл до 10 мкг/мл. Активацию Treg оценивали измерением процентного содержания пролиферирующих клеток, а также уровней экспрессии CD71 и секреции IL-10.

[0207] Проточная цитометрия и анализ FACS - нетрансдуцированные и CV-CAR-экспрессирующие Treg-клетки собирали и центрифугировали при 300× g в течение 5 мин, и затем ресуспендировали в 1× буфере RoboSep (StemCell Technologies) с окрашивающим антителом для поверхностного CD71 и красителем для оценки пролиферации клеток Cell Trace Violet (CTV) (Invitrogen). Treg инкубировали в течение 30 мин при 4°C, затем центрифугировали и промывали 1× буфером RoboSep. Окрашенные клетки затем анализировали проточной цитометрией.

Результаты

[0208] Активацию Treg в ответ на цитруллинированный виментин (CV) оценивали *in vitro*. На фиг. 13 показана дозозависимая CV-индуцированная активация клеток CV-CAR Treg, о чем свидетельствует увеличение пролиферации клеток, экспрессии CD71 и секреции IL-10. В противоположность, нетрансдуцированные Treg-клетки не активировались под действием CV. Полученные результаты демонстрируют, что активация Treg при стимуляции CV специфична для CV-CAR-экспрессирующих Treg-клеток.

[0209] Количество CV, присутствующего в синовиальной жидкости здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом (РА), оценивали с использованием ELISA, как показано на фиг. 14. Репортерные клетки Jurkat, экспрессирующие один из трех различных CV-CAR или контрольный CD19-CAR, инкубировали с возрастающими количествами синовиальной жидкости, и ответные реакции измеряли в качестве показателя связывания CV-CAR и передачи сигнала для активации Т-клеток. На фиг. 14 показано, что клетки Jurkat (иммортиализованные Т-лимфоциты человека), экспрессирующие CV-CAR1 (BVCA1) и CV-CAR2 (SBT01G), но не CV-CAR3 (C03) или CD19-CAR, демонстрируют усиление ответа на синовиальную жидкость (СЖ). На фиг. 14 также показано, что CV-CAR2 Т-клетки (SBT01G) активировались образцами СЖ от большего числа пациентов с РА, чем CV-CAR1 Т-клетки (BVCA1).

[0210] Для демонстрации того, что Treg, экспрессирующие CV-CAR, активируются цитруллинированным антигеном, находящимся в синовиальной жидкости пациентов с РА,

нетрансдуцированные и CV-CAR2 Treg инкубировали с синовиальной жидкостью от пациентов с РА или носителем и измеряли уровни пролиферации и экспрессии CD71. На фиг. 15 показано, что CV-CAR2 Treg-клетки от двух доноров активировались специфичным для синовиальной жидкости от пациентов с РА образом.

[0211] В совокупности полученные результаты показывают, что CV-CAR Treg-клетки способны связываться с цитруллинированным антигеном, который находится в синовиальной жидкости от пациентов с РА, что приводит к активации, необходимой для проявления супрессивных функций.

Пример 6: оценка CV-индуцированной супрессии Teff-клеток под действием CV-CAR Treg

[0212] Анализ супрессии Treg - Treg-клетки, экспрессирующие CV-CAR, получали, как описано выше, из свежих человеческих лейкопаков в 96-луночном планшете с U-образным дном. Treg инкубировали с CV в качестве антигенного стимула или с контролем, носителем. Treg сокультивировали либо с CD3/CD28-активированными, либо с CD19-CAR-специфичными Teff-клетками для оценки подавления Treg клеток-мишеней. Teff-клетки сокультивировали при следующих соотношениях Treg:Teff: (CD3/CD28-активация) 1:4=0,25, 1:2=0,5, 1:1=1, 2:1=2 и 4:1=4 или (специфично для CD19) 1:4, 1:2, 1:1, 2:1 и 4:1.

Результаты

[0213] На фиг. 16А показано, что CV-CAR Treg, стимулированные CV, были способны подавлять пролиферацию CD3/CD28-активированных клеток Teff при низком соотношении Treg:Teff. На фиг. 16В показано, что CV-CAR Treg, стимулированные CV, также были способны подавлять пролиферацию клеток CD19-CAR Teff при низком соотношении Treg:Teff.

Пример 7: анализ CV-CAR Treg на модели CV-ассоциированного воспаления легких на грызунах

[0214] У пациентов с ревматоидным артритом (РА) стабильно высокие концентрации цитруллинированного виментина (CV) в синовиальной жидкости указывают на то, что CV является важным биомаркером РА у человека. Однако имеющиеся в настоящее время мышинные модели РА демонстрируют непостоянные уровни CV, что усложняет анализ *in vivo* CV-CAR Treg. Для индукции продукции и высвобождения CV во внеклеточный матрикс, была разработана мышинная модель воспаления легких, индуцированного ЛПС. Модель характеризуется острой воспалительной реакцией, включая легочную нейтрофилию и повышенную секрецию провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-1-бета (IL-1b) и фактора некроза опухолей альфа (TNF-альфа), а также накопление CV в легочной ткани в течение нескольких дней после интраназального введения ЛПС. Было показано, что химерные антигенные рецепторы (CAR), специфичные для CV, реагируют на аккумулированный CV-белок в легочной ткани, что приводит к выживаемости, пролиферации и увеличению супрессивной активности антигенспецифическим образом соответствующих CV-CAR Treg-клеток.

Методы

[0215] Мышей NCG с ослабленным иммунитетом в возрасте от шести до восьми недель получали из питомника Charles River Laboratories. Мышей рандомизировали по массе тела и разделяли на группы по 5-10 животных. Мышей подвергали интраназальному (и/н) введению ЛПС (5 мг/кг) на сутки 0, 1, 6 и 12 для индукции воспаления легких, а также высвобождения и накопления цитруллинированного виментина (CV) в пораженных тканях. На сутки 0 CV-CAR Treg-клетки собирали из активно растущих культур, стимулирующие частицы удаляли магнитом, и затем Treg метили красителем для оценки пролиферации клеток Cell Trace Violet (CTV) (Invitrogen). Приблизительно через 4 ч после первоначального введения ЛПС, меченные CTV Treg доводили до титра 25×10^6 клеток/мл в 0,9% стерильном физиологическом растворе (NaCl) и внутривенно (в/в) вводили дозу 200 мкл, так что каждая мышь получала в общей сложности 5×10^6 клеток. После переноса адоптивных клеток CV-CAR Treg или контрольных CD19-CAR Treg всем мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили IL-2 (160000 ME) на сутки 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 и 12. Мышей ежедневно контролировали на наличие каких-либо клинических признаков нарушения функционального состояния, и массу тела измеряли дважды в неделю. Мышей подвергали эвтаназии на сутки 13, и отбирали селезенку и легкие и обрабатывали для получения суспензии отдельных клеток для анализа проточной цитометрией человеческих CV-CAR и CD19-CAR Treg.

Результаты

[0216] На фиг. 17 показан примерный график индукции CV-ассоциированного воспаления легких у мышей и активации CV-CAR Treg-клеток *in vivo*.

Результаты

[0217] На фиг. 18А показано, как индекс пролиферации рассчитывали на основе данных проточной цитометрии, тогда как на фиг. 18В показано, как на основе тех же данных рассчитывали кратное изменение соотношения EGFR (маркер CAR).

[0218] На фиг. 19А показано, что абсолютное количество CV-CAR Treg было достоверно выше в легочной ткани мышей с воспалением легких, индуцированным ЛПС. На фиг. 19В показано, что индекс пролиферации CV-CAR Treg был достоверно выше в легочной ткани мышей с воспалением легких, индуцированным ЛПС. Полученные результаты демонстрируют, что CV-CAR Treg обладают улучшенной способностью по сравнению с контрольными Treg к приживаемости и пролиферации в воспаленных тканях легких, характеризующихся накоплением цитруллинированного виментина. Таким образом, эта модель воспаления легких на мышах позволяет тестировать человеческие CV-CAR Treg *in vivo*.

Примеры вариантов осуществления

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, один или более костимулирующих доменов и внутриклеточный сигнальный домен, где антигенсвязывающий домен специфически связывается с цитруллинированным полипептидом, где необязательно антигенсвязывающий домен специфически связывается с тремя или более различными

цитруллинированными белками или их цитруллинированными фрагментами.

2. CAR по варианту осуществления 1, где антигенсвязывающий домен связывается со множеством различных цитруллинированных белков или их цитруллинированных фрагментов.

3. CAR по варианту осуществления 1, где антигенсвязывающий домен связывается с одним или более из: (i) цитруллинированного виментина, (ii) цитруллинированного филаггрина, (iii) цитруллинированного фибриногена и (iv) их цитруллинированных пептидных фрагментов, например по меньшей мере из 10, 12, 14 или 16 аминокислот.

4. CAR по варианту осуществления 1, где антигенсвязывающий домен связывается по меньшей мере с двумя из: (i) цитруллинированного виментина, (ii) цитруллинированного филаггрина и (iii) цитруллинированного фибриногена или их цитруллинированных пептидных фрагментов.

5. CAR по варианту осуществления 1, где антигенсвязывающий домен связывается со всеми тремя из: (i) цитруллинированного виментина, (ii) цитруллинированного филаггрина и (iii) цитруллинированного фибриногена или их цитруллинированных пептидных фрагментов.

6. CAR по варианту осуществления 5, который также связывается с цитруллинированным тенасцином C.

7. CAR по варианту осуществления 1, где антигенсвязывающий домен содержит VH-домен и VL-домен, где:

(i) VH-домен содержит VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и

(ii) VL-домен мишень-связывающего домена содержит VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43.

8. CAR по варианту осуществления 1, где внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3-дзета.

9. CAR по варианту осуществления 1, где по меньшей мере один костимулирующий домен получен из члена группы, состоящей из: FcεR1g, Fcγ, CD28, 4-1BB, CTLA-4, гибрида CTLA-4/CD-28, DAP10, CD27 и 2B4, где необязательно по меньшей мере один костимулирующий домен содержит костимулирующий домен CD28 и/или 4-1BB.

10. CAR по варианту осуществления 1, где антигенсвязывающий домен содержит антитело, фрагмент антитела, верблюжье нанотело, антитело, содержащее только тяжелые цепи, или аптамер.

11. CAR по любому из вариантов осуществления 1-10, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8 или трансмембранный CD28; и шарнирный домен представляет собой шарнирный домен CD8 или шарнирный домен

CD28; и/или дополнительно содержит сигнальный пептид, где необязательно сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид CD8 или сигнальный пептид GM-CSF.

12. CAR по варианту осуществления 11, где антигенспецифический связывающий домен содержит одноцепочечный фрагмент.

13. CAR по варианту осуществления 12, где одноцепочечный фрагмент содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), где необязательно фрагмент scFv содержит: (a) VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1; и (b) VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.

14. CAR по варианту осуществления 13, где фрагмент scFv содержит:

(a) VH, выбранный из:

(1) SBT01 VH (M)

HLHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSINDTTYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYY
RGNTHYNSSLRSRVVTMSVDTSKNRFSCLKVTSVTAADTAVYYCARLDPFDYWGRGTLVT
VSS (SEQ ID NO:1); или

(2) SBT01 VH (G)

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS
GSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDPFDYWGRGTLVTVS
S (SEQ ID NO:2); и

(b) VL, выбранный из:

(1) SBT01 VL (M)

SYVLTQPPSVSLAPGETATITCGGDDIENQNVNWWYQQKSGQAPMLLIFFDTRRPS
GIPERFSGSRSEDTANLTITRVEAGDDADYFCQVYDRKTDHQVFGPGTTVTVL (SEQ ID
NO:3), или

(2) SBT01 VL (G)

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPS
GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHQVFGTGTKVTVL (SEQ ID
NO:4).

15. CAR по варианту осуществления 14, где фрагменты VH-VL соединены линкером, выбранным из группы, состоящей из (i) GGGs×3 (SEQ ID NO:20), (ii) Whitlow 218 (SEQ ID NO:21) и (iii) AB Pur (SEQ ID NO:22).

16. CAR по варианту осуществления 13, где scFv содержит аминокислотную последовательность:

(a) SBT01G - VHVL - линкер GGGs×3 - pSB_0149

HLHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSINDTTYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYY
RGNTHYNSSLRSRVVTMSVDTSKNRFSCLKVTSVTAADTAVYYCARLDPFDYWGRGTLVT
VSSGGGGSGGGGSGGGGSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQK
GQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHQV
GTGTKVTVLR (SEQ ID NO:5) (линкер GGGs×3 подчеркнут); или

(b) SBT01G - VHVL - линкер Whitlow 218 - pSB_0158

HLHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSINDTTYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYY

RGNTHYNSSLRSRVTMSVDTSKNRFSCLKVTSVTAADTAVYYCARLDPFDYWGRGTLVT
 VSSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQ
 KPGQAPVLVIYYDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHQ
 VFGTGTKVTVLR (SEQ ID NO:6) (линкер Whitlow 218 подчеркнут); или

(с) SBT01G - VHVL - линкер AB pur - pSB_0159

HLHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSINDTTYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYY
 RGNTHYNSSLRSRVTMSVDTSKNRFSCLKVTSVTAADTAVYYCARLDPFDYWGRGTLVT
 VSSASSGGSTSGSGKPGSGEGSSGSARSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSV
 HWYQQKPGQAPVLVIYYDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWD
 SSSDHQVFGTGTKVTVLR (SEQ ID NO:7) (линкер AB pur подчеркнут).

17. CAR по любому из вариантов осуществления 1-16, где костимулирующий домен содержит костимулирующий домен CD28, 41BB, OX40, OX40, CD40L, MyD88, CD40, CD27, ICOS или RANK/TRANCE-R.

18. Нуклеиновая кислота, кодирующая CAR по любому из вариантов осуществления 1-17.

19. Нуклеиновая кислота по варианту осуществления 18, содержащая ДНК или РНК.

20. Нуклеиновая кислота по варианту осуществления 18, где:

VH кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей:

CACCTGCACTTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTTGTGAAGCCTTCGGAGACCC
 TGTCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAACGATACTTACTACTGGG
 GCTGGATTCGCCAGCCCCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTAC
 CGGGGGAACACCCACTACAATTCGTCCCTGAGGAGTCGCGTCACCATGTCTGTGCAC
 ACTTCCAAGAACCGATTCTCCCTGAAGGTCACTTCTGTGACTGCCGCAGACACGGCT
 GTCTATTACTGTGCGAGACTCGACCCATTTGACTACTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTC
 ACTGTCTCGAGC, или

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCC
 TGTCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTACTACTGGG
 GCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTAT
 AGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGA
 CACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCAGACACGG
 CTGTGTATTACTGTGCGAGACTCGACCCATTTGACTACTGGGGCCGTGGCACCCCTGG
 TCACTGTCTCGAGC; и

VL кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей:

TCSTATGTCCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCGCTGGCCCCGGGAGAGACGG
 CCACAATTACTTGTGGTGGAGACGACATTGAAAATCAAATGTCAACTGGTATCAG
 CAGAAGTCAGGTCAGGCCCTATGCTGCTCATCTTCTTTGATAACAGACGGCCCTCA
 GGGATCCCGGAGCGATTCTCTGGCTCCAGGTCTGAGGACACGGCCAACCTGACCAT
 CACCAGGGTCGAGGCCGGGGATGACGCCGACTATTTCTGTGAGGTGTATGATAGGA
 AGACTGATACCAAGTCTTCGGACCTGGGACCACGGTCACCGTCCTA, или

TCSTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGG

CCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAG
 CAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATTATGATAGCGACCGGCCCTCA
 GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATC
 AGCAGGGTTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGACAGTAG
 TAGTGATACCAAGTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA.

21. Нуклеиновая кислота по варианту осуществления 20, где фрагменты VH и VL соединены линкером и содержат последовательность нуклеиновой кислоты: (i) SEQ ID NO:12, (ii) SEQ ID NO:13 или (iii) SEQ ID NO:13 или (iii) SEQ ID NO:14.

22. Экспрессионный вектор, содержащий контрольную последовательность экспрессии, операбельно связанную с последовательностью нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 16-21.

23. Экспрессионный вектор по варианту осуществления 22, где контрольная последовательность экспрессии содержит регуляторную область, где регуляторная область выбрана из группы, состоящей из: промоторных последовательностей, энхансерных последовательностей, отвечающих элементов, сайтов узнавания белка, индуцибельных элементов, белок-связывающих последовательностей, 5' и 3'-нетранслируемых областей, сайтов инициации транскрипции, последовательности терминации, последовательности полиаденилирования, сигнала ядерной локализации, сигналов и интронов.

24. Экспрессионный вектор по варианту осуществления 23, где вектор представляет собой аденовирусный вектор, лентивирусный вектор или плазмиду.

25. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по вариантам осуществления 22, 23 или 24.

26. Модифицированная Т-клетка, которая модифицирована для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) по любому из вариантов осуществления 1-17.

27. Модифицированная Т-клетка по варианту осуществления 26, где Т-клетка представляет собой Т-клетку млекопитающего.

28. Модифицированная Т-клетка по варианту осуществления 27, где Т-клетка представляет собой Тreg-клетку.

29. Модифицированная Т-клетка по варианту осуществления 28, где Т-клетка представляет собой Т-клетку человека.

30. Модифицированная Т-клетка по варианту осуществления 29, где Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку.

31. Модифицированная Т-клетка по варианту осуществления 30, где Т-клетка представляет собой CD4+, CD25+ и CD127lo.

32. Фармацевтическая композиция, содержащая множество модифицированных Т-клеток по любому из вариантов осуществления 26-31 и фармацевтически приемлемый носитель.

33. Способ лечения субъекта, страдающего ревматоидным артритом, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по варианту осуществления 32.

34. Способ по варианту осуществления 33, где субъектом является человек.
35. Способ по вариантам осуществления 33 или 34, где фармацевтическую композицию вводят в синовиальную оболочку субъекта.
36. Способ по вариантам осуществления 33 или 34, где фармацевтическую композицию вводят внутривенно.
- 37А. Способ по варианту осуществления 33, где введение включает:
- (a) выделение Т-клеток из биологического образца, полученного от субъекта;
 - (b) обогащение Т-клеток регуляторными Т-клетками (Treg);
 - (c) трансфекцию обогащенных Treg-клеток экспрессионным вектором, содержащим контрольную последовательность экспрессии, операбельно связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с цитруллинированным полипептидом;
 - (d) экспандирование трансфектированных Treg-клеток; и (e) введение субъекту экспандированных Treg-клеток.
- 37В. Способ лечения субъекта, страдающего ревматоидным артритом, включающий:
- (a) выделение Т-клеток из биологического образца, полученного от субъекта;
 - (b) обогащение Т-клеток регуляторными Т-клетками (Treg);
 - (c) трансфекцию обогащенных Treg-клеток экспрессионным вектором, кодирующим CAR по любому из вариантов осуществления 1-17;
 - (d) экспандирование трансфектированных Treg-клеток; и
 - (e) введение субъекту экспандированных Treg-клеток.
38. Способ по варианту осуществления 37, где экспандирование включает использование анти-CD3/CD28-покрытых частиц.
39. Способ по варианту осуществления 37, где при экспандировании не используются анти-CD3/CD28-покрытые частицы.
40. Способ по варианту осуществления 37, где трансфекция происходит с использованием вирусного вектора, электропорации, теплового шока, бактериофага, обработки ультразвуком или фосфата кальция.
41. Способ по любому из вариантов осуществления 37-40, дополнительно включающий введение субъекту одного или более противовоспалительных и/или терапевтических средств.
42. Способ по варианту осуществления 41, где противовоспалительный агент содержит антитело, которое ингибирует провоспалительный цитокин.
43. Способ по варианту осуществления 42, где противовоспалительный агент представляет собой анти-TNF антитело, анти-IL-6 антитело или их комбинацию.
44. Набор, включающий контейнер, содержащий фармацевтическую композицию по варианту осуществления 32, сообщающуюся через трубку для жидкости с капельной камерой, где капельная камера сообщается через трубку для жидкости с иглой для внутривенного введения.

45. Набор по варианту осуществления 44, где контейнер содержит мешок.

46. Набор по варианту осуществления 44, где трубка для жидкости между контейнером и иглой содержит один или более Y-образных портов и роликовый зажим.

[0219] Следует понимать, что описание и фигуры не предназначены для ограничения изобретения конкретной раскрытой формой, а напротив, намерение состоит в том, чтобы охватить все модификации, эквиваленты и альтернативы, не отступающие от сущности и объема настоящего изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения. Дополнительные модификации и альтернативные варианты осуществления различных аспектов изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники с учетом этого описания. Соответственно, это описание и фигуры следует рассматривать только в качестве иллюстративных и предназначенных для обучения специалистов в данной области техники общему способу осуществления настоящего изобретения. Следует понимать, что формы изобретения, показанные и описанные здесь, следует рассматривать в качестве примеров вариантов осуществления. Элементы и материалы могут быть заменены иллюстрированными и описанными здесь, части и процессы могут быть изменены на противоположные или опущены, а некоторые признаки изобретения могут использоваться независимо, и все это будет очевидно для специалистов в данной области техники после ознакомления с описанием изобретения. В элементы, описанные здесь, могут быть внесены изменения без отклонения от сущности и объема изобретения, как описано в следующей формуле изобретения. Заголовки, используемые здесь, предназначены только для организационных целей и не предназначены для ограничения объема описания.

[0220] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в этом описании, включены сюда посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент была конкретно и индивидуально указана как включенная посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, один или более костимулирующих доменов и внутриклеточный сигнальный домен, где антигенсвязывающий домен специфически связывается с тремя или более различными цитруллинированными белками или их цитруллинированными фрагментами.

2. CAR по п.1, где антигенсвязывающий домен связывается со всеми тремя из: (i) цитруллинированного виментина, (ii) цитруллинированного филаггрина и (iii) цитруллинированного фибриногена или их цитруллинированных пептидных фрагментов.

3. CAR по п.2, где антигенсвязывающий домен также связывается с цитруллинированным тенаксином С.

4. CAR по п.1, где антигенсвязывающий домен содержит VH-домен и VL-домен, где:
(i) VH-домен содержит VH-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32, VH-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и VH-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и

(ii) VL-домен мишень-связывающего домена содержит VL-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, VL-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и VL-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43.

5. CAR по п.1, где внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3-дзета.

6. CAR по п.1, где по меньшей мере один костимулирующий домен получен из члена группы, состоящей из FcεR1g, Fcγ, CD28, 4-1BB, CTLA-4, гибрида CTLA-4/CD-28, DAP10, CD27 и 2B4 или их комбинаций, где необязательно по меньшей мере один костимулирующий домен содержит костимулирующий домен CD28 и/или 4-1BB.

7. CAR по п.1, где антигенсвязывающий домен содержит антитело, фрагмент антитела, верблужье нанотело, антитело, содержащее только тяжелые цепи, или аптамер.

8. CAR по п.1, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8 или трансмембранный CD28.

9. CAR по п.1, где шарнирный домен представляет собой шарнирный домен CD8 или шарнирный домен CD28.

10. CAR по п.1, дополнительно содержащий сигнальный пептид.

11. CAR по п.10, где сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид CD8 или сигнальный пептид GM-CSF.

12. CAR по п.1, где антигенспецифический связывающий домен содержит одноцепочечный фрагмент.

13. CAR по п.12, где одноцепочечный фрагмент содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

14. CAR по п.13, где фрагмент scFv содержит:

(a) VH-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1; и

(b) VL-домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.

15. CAR по п.13, где фрагмент scFv содержит:

(a) VH, выбранный из:

(1) SBT01 VH (M)

HLHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSINDTTYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYY
RGNTHYNSSLRSRV TMSVDTSKNRFS LKVTSVTAADTAVYYCARLDPFDYWGRGTLVT
VSS (SEQ ID NO:1); или

(2) SBT01 VH (G)

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS
GSTYYNPSLKS RV TISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDPFDYWGRGTLVTVS
S (SEQ ID NO:2); и

(b) VL, выбранный из:

(1) SBT01 VL (M)

SYVLTQPPSVSLAPGETATITCGGDDIENQNVN WYQQKSGQAPMLLIFFDTRRPS
GIPERFSGRS EDTANLTITRVEAGDDADYFCQVYDRKTDHQVFGPGTTVTVL (SEQ ID
NO:3), или

(2) SBT01 VL (G)

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPS
GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYVCQVWDSSSDHQVFGTGTKVTVL (SEQ ID
NO:4).

16. CAR по п.15, где фрагменты VH-VL соединены линкером, выбранным из группы, состоящей из (i) GGGS×3 (SEQ ID NO:20), (ii) Whitlow 218 (SEQ ID NO:21) и (iii) AB Pur (SEQ ID NO:22).

17. CAR по п.16, где scFv содержит аминокислотную последовательность:

(a) SBT01G - VHVL - линкер GGGS×3 - pSB_0149 SEQ ID NO:5; или

(b) SBT01G - VHVL - линкер Whitlow 218 - pSB_0158 SEQ ID NO:6; или

(c) SBT01G - VHVL - линкер AB pur - pSB_0159 SEQ ID NO:7.

18. Нуклеиновая кислота, кодирующая CAR по любому из пп. 1-17.

19. Нуклеиновая кислота по п.18, содержащая ДНК или РНК.

20. Нуклеиновая кислота по п.18, где: VH кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9; VL кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

21. Нуклеиновая кислота по п.20, где фрагменты VH и VL соединены линкером и содержат последовательность нуклеиновой кислоты: (i) SEQ ID NO:12, (ii) SEQ ID NO:13 или (iii) SEQ ID NO:13, или (iii) SEQ ID NO:14.

22. Экспрессионный вектор, содержащий контрольную последовательность экспрессии, функционально связанную с последовательностью нуклеиновой кислоты по п.21.

23. Экспрессионный вектор по п.22, где контрольная последовательность

экспрессии содержит регуляторную область, где регуляторная область выбрана из группы, состоящей из: промоторных последовательностей, энхансерных последовательностей, отвечающих элементов, сайтов узнавания белка, индуцибельных элементов, белок-связывающих последовательностей, 5' и 3'-нетранслируемых областей, сайтов инициации транскрипции, последовательности терминации, последовательности полиаденилирования, сигнала ядерной локализации, сигналов и интронов.

24. Экспрессионный вектор по п.23, где вектор представляет собой аденовирусный вектор, лентивирусный вектор или плазмиду.

25. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по п.24.

26. Модифицированная Т-клетка, которая модифицирована для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) по любому из пп. 1-17.

27. Модифицированная Т-клетка по п.26, где Т-клетка представляет собой Т-клетку млекопитающего.

28. Модифицированная Т-клетка по п.27, где Т-клетка представляет собой Treg-клетку.

29. Модифицированная Т-клетка по п.28, где Т-клетка представляет собой Т-клетку человека.

30. Модифицированная Т-клетка по п.29, где Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку.

31. Модифицированная Т-клетка по п.30, где Т-клетка представляет собой CD4+, CD25+ и CD127lo.

32. Фармацевтическая композиция, содержащая множество модифицированных Т-клеток по п.31 и фармацевтически приемлемый носитель.

33. Способ лечения субъекта, страдающего ревматоидным артритом, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п.32.

34. Способ по п.33, где субъектом является человек.

35. Способ по п.33, где фармацевтическую композицию вводят в синовиальную оболочку субъекта.

36. Способ по п.33, где фармацевтическую композицию вводят внутривенно.

37. Способ лечения субъекта, страдающего ревматоидным артритом, включающий:

(а) выделение Т-клеток из биологического образца, полученного от субъекта;

(b) обогащение Т-клеток регуляторными Т-клетками (Treg);

(c) трансфекцию обогащенных Treg-клеток экспрессионным вектором, кодирующим CAR по любому из пп. 1-17;

(d) экспандирование трансфектированных Treg-клеток; и

(e) введение субъекту экспандированных Treg-клеток.

38. Способ по п.37, где экспандирование включает использование анти-CD3/CD28-покрытых частиц.

39. Способ по п.37, где при экспандировании не используются анти-CD3/CD28-покрытые частицы.

40. Способ по п.37, где трансфекция происходит с использованием вирусного вектора, электропорации, теплового шока, бактериофага, обработки ультразвуком или фосфата кальция.

41. Способ по п.37, дополнительно включающий введение субъекту одного или более противовоспалительных и/или терапевтических средств.

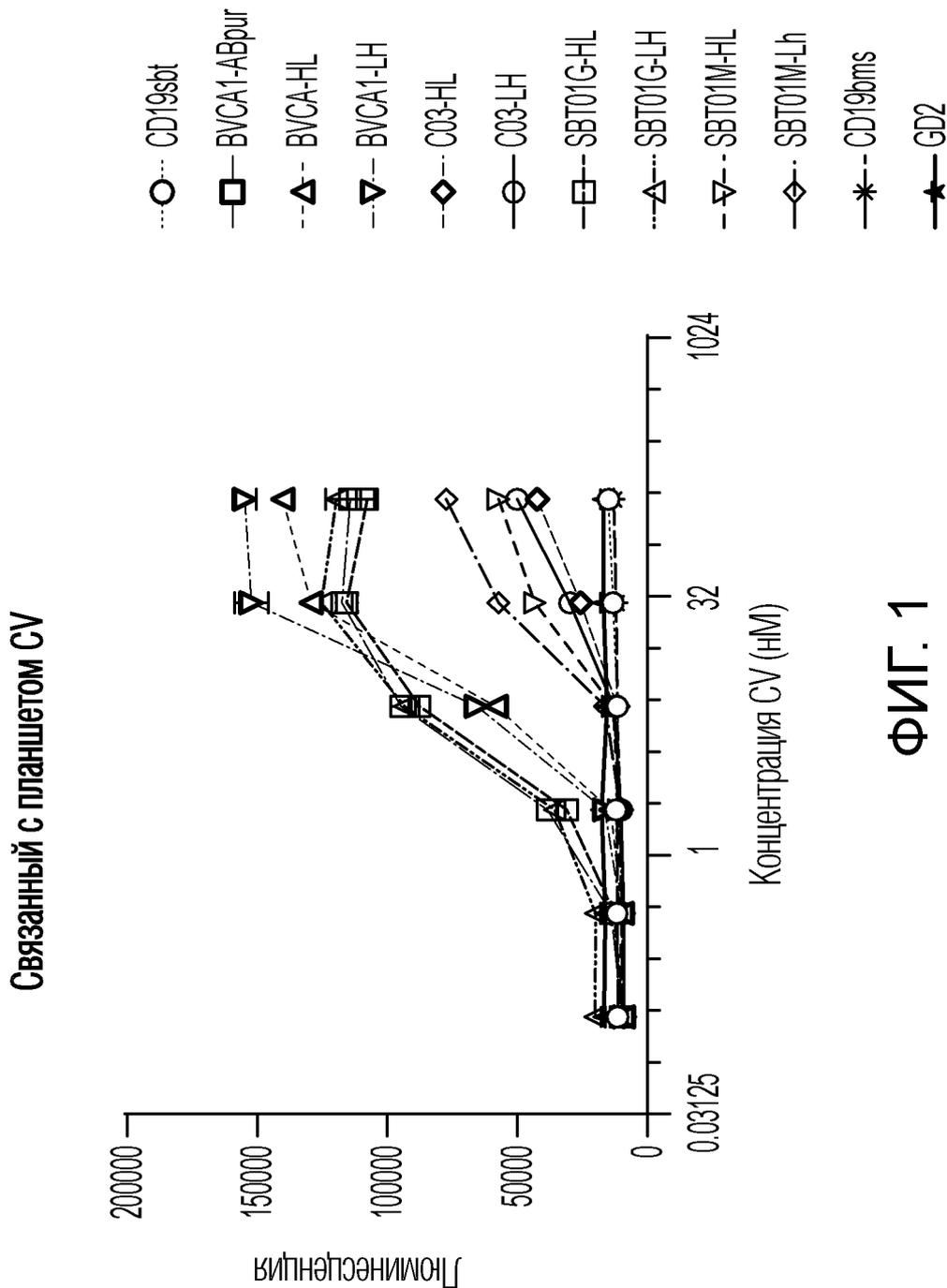
42. Способ по п.41, где противовоспалительный агент содержит антитело, которое ингибирует провоспалительный цитокин.

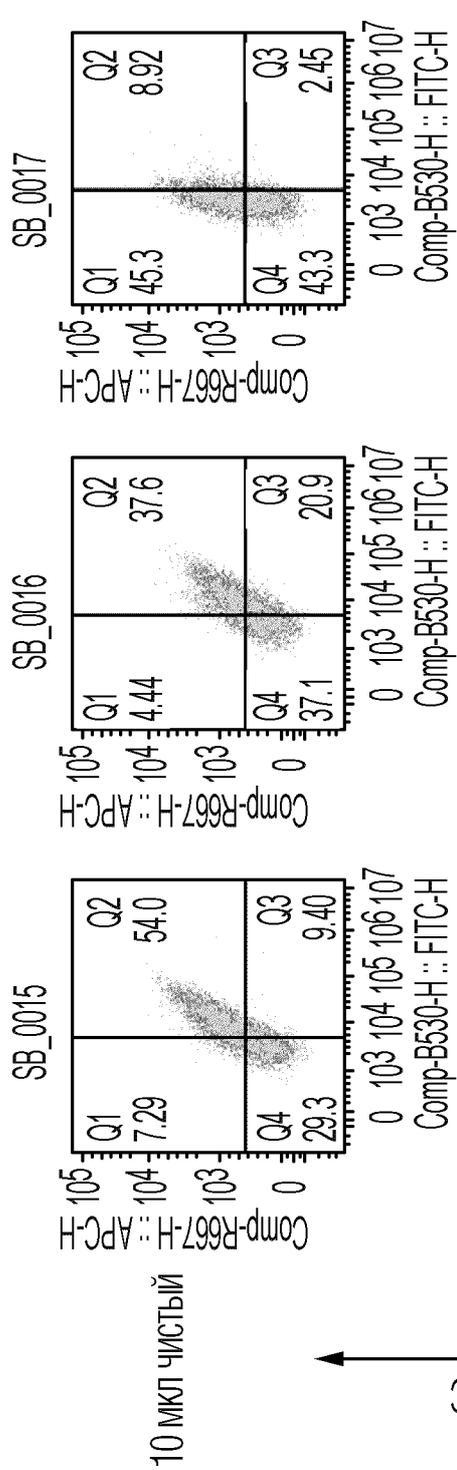
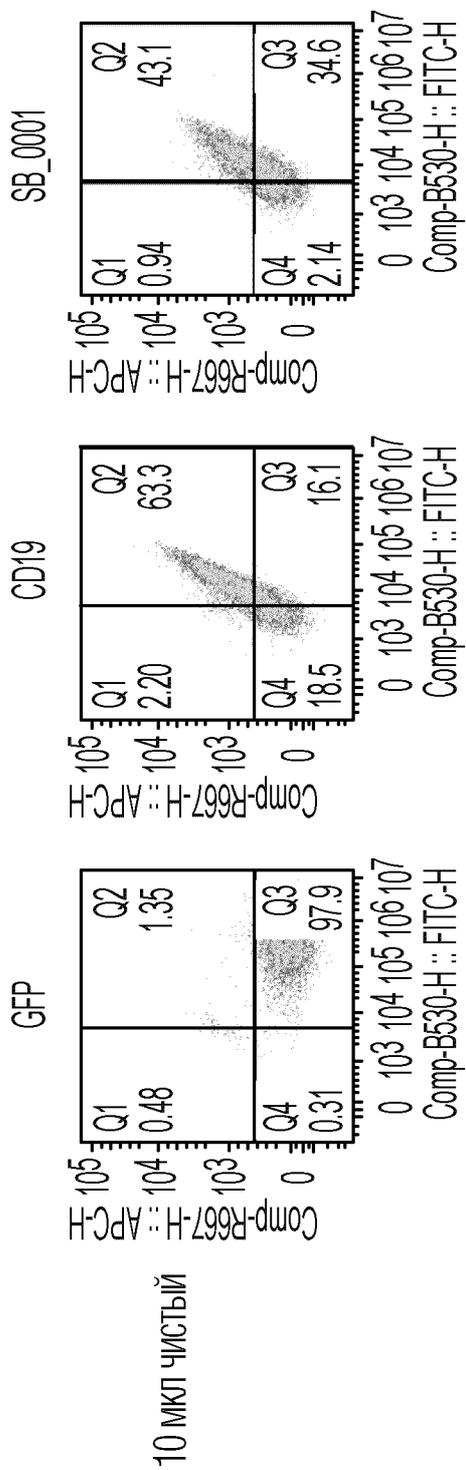
43. Способ по п.42, где противовоспалительный агент представляет собой анти-TNF антитело, анти-IL-6 антитело или их комбинацию.

44. Набор, включающий контейнер, содержащий фармацевтическую композицию по п.32, сообщающуюся через трубку для жидкости с капельной камерой, где капельная камера сообщается через трубку для жидкости с иглой для внутривенного введения.

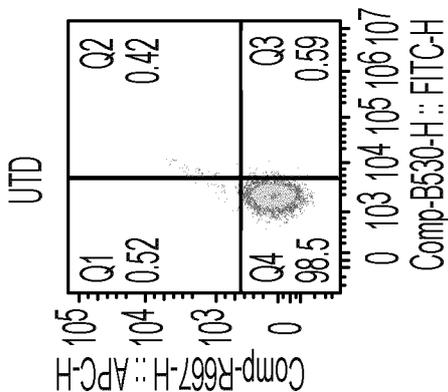
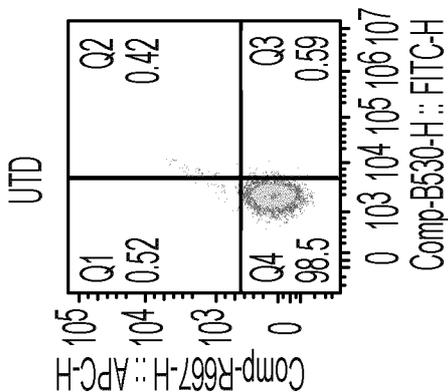
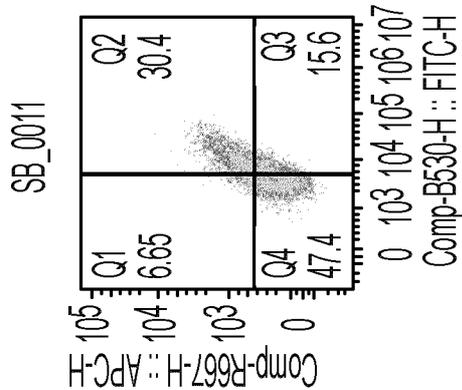
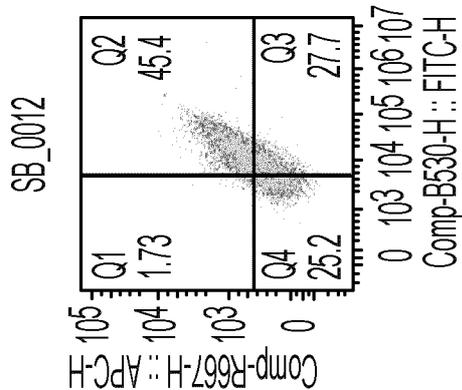
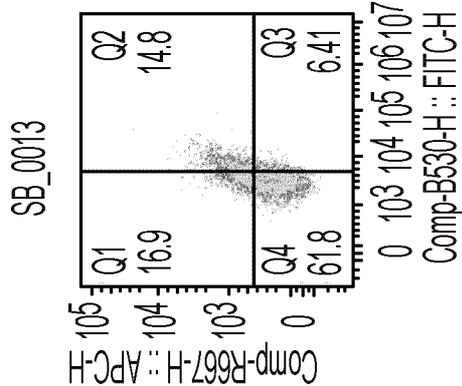
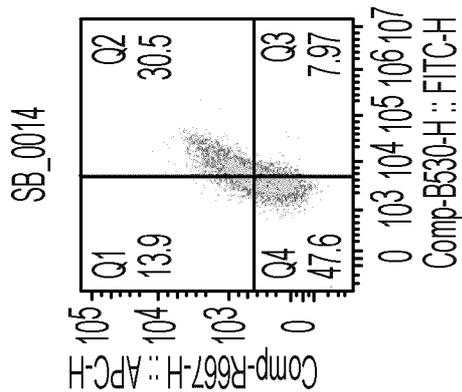
45. Набор по п.44, где контейнер содержит мешок.

46. Набор по п.44, где трубка для жидкости между контейнером и иглой содержит один или более Y-образных портов и роликовый зажим.

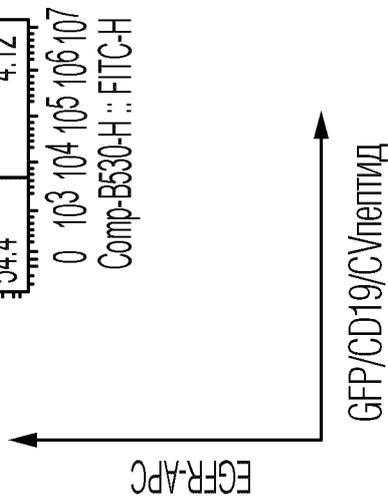




ФИГ. 3

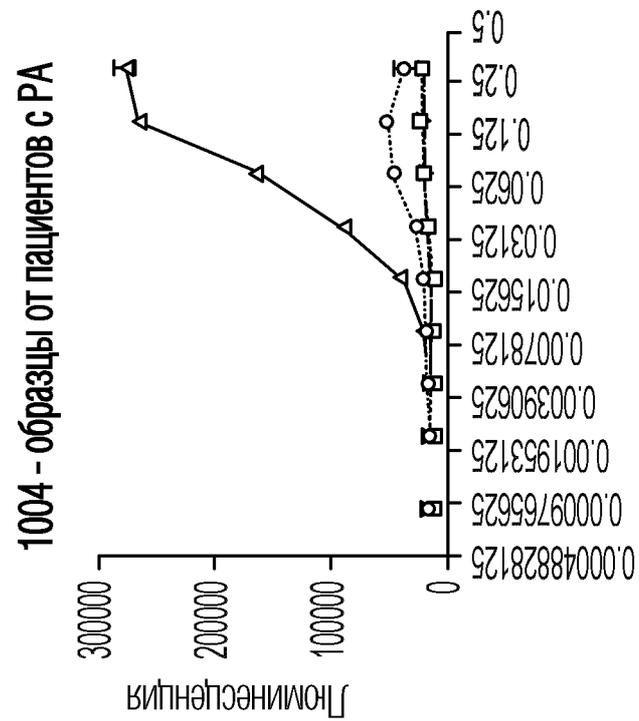


pSB_001-BVCA1 с линкером ABprig
 pSB_0011-BVCA1G4S линкер, тяжелая цепь-легкая цепь
 pSB_0012-BVCA1G4S линкер, легкая цепь-тяжелая цепь
 pSB_0013-CO3 scFv, тяжелая цепь-легкая цепь
 pSB_0014-CO3 scFv, легкая цепь-тяжелая цепь
 pSB_0015-STB01G scFv, тяжелая цепь-легкая цепь
 pSB_0016-STB01G scFv, легкая цепь-тяжелая цепь
 pSB_0017-STB01M scFv, тяжелая цепь-легкая цепь
 pSB_0018-STB01MscFv, легкая цепь-тяжелая цепь

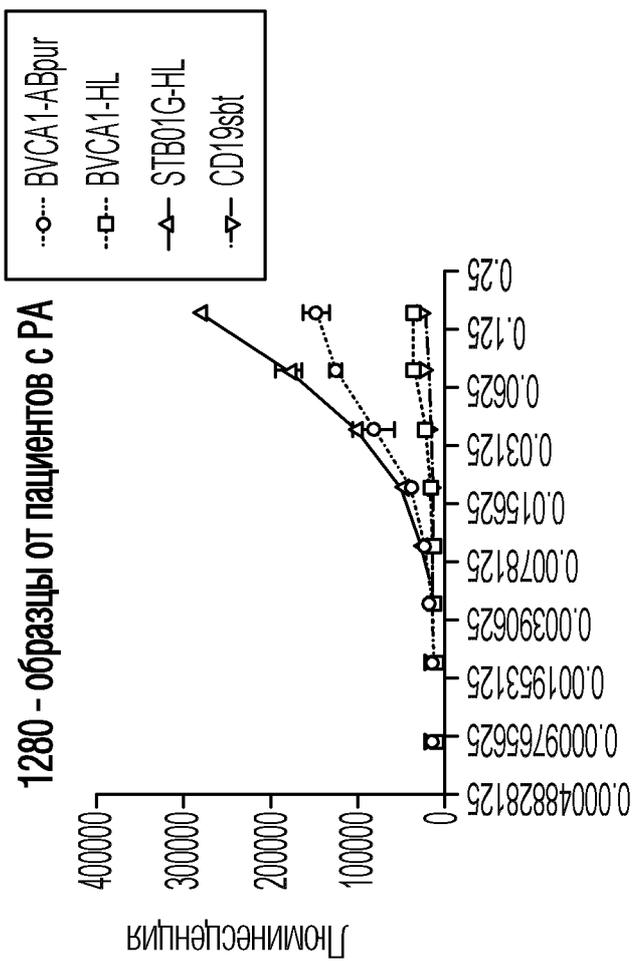


ФИГ. 3

ПРОДОЛЖЕНИЕ

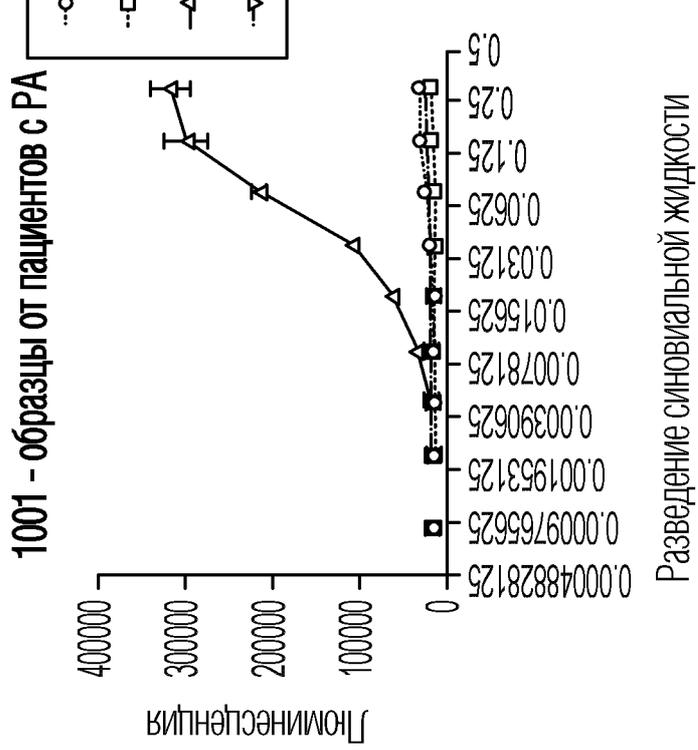
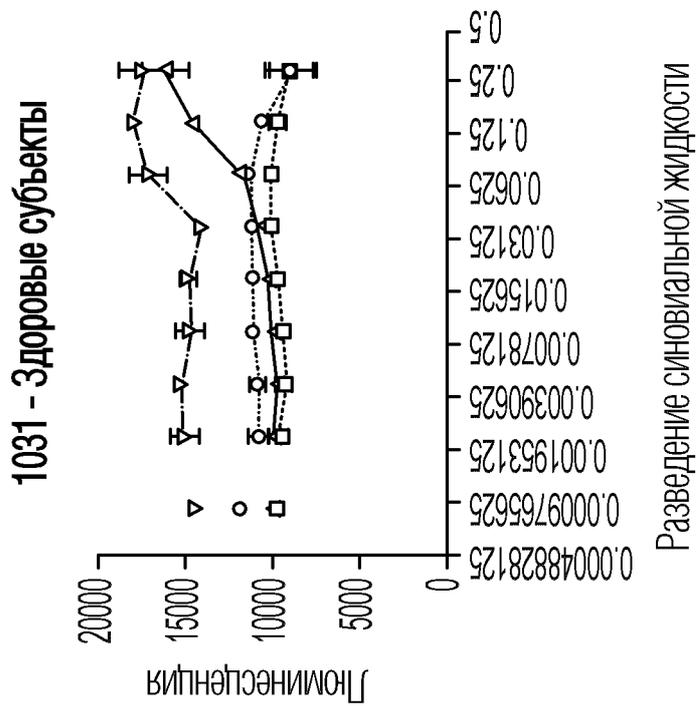


Разведение синовиальной жидкости



Разведение синовиальной жидкости

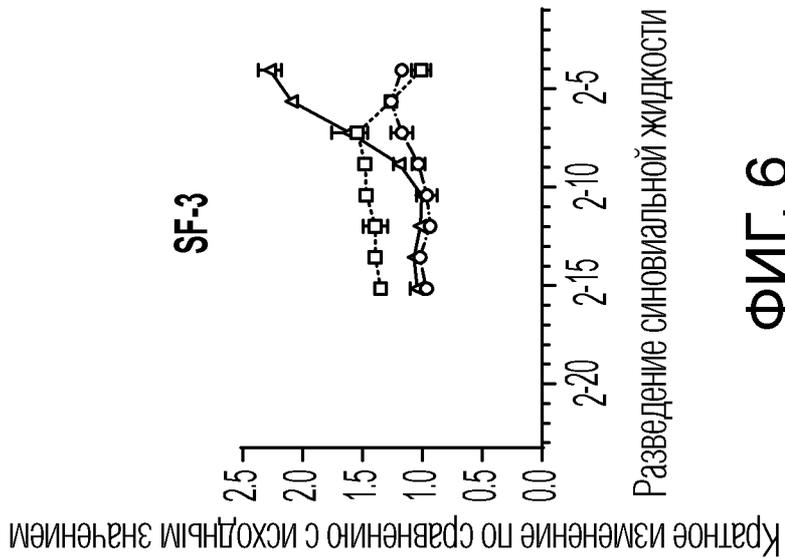
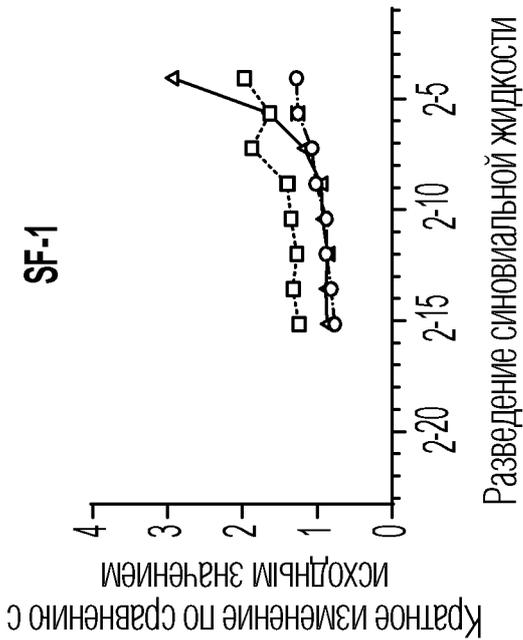
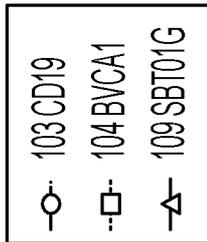
ФИГ. 5



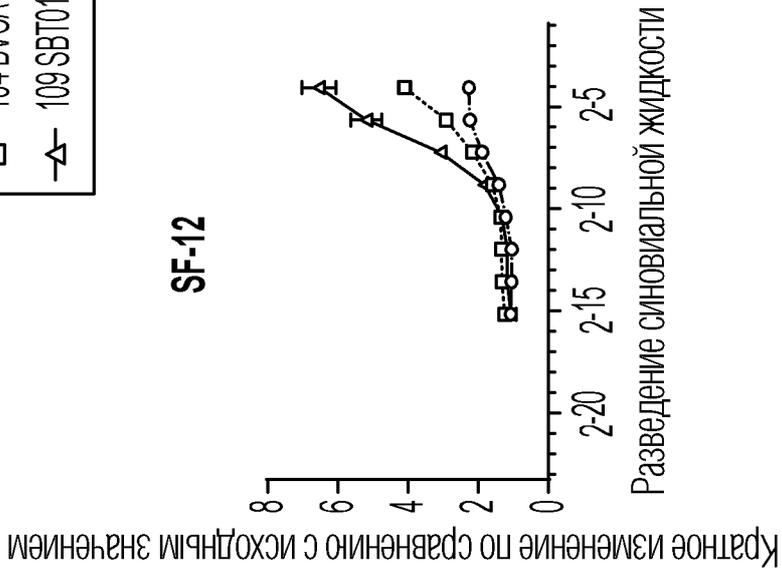
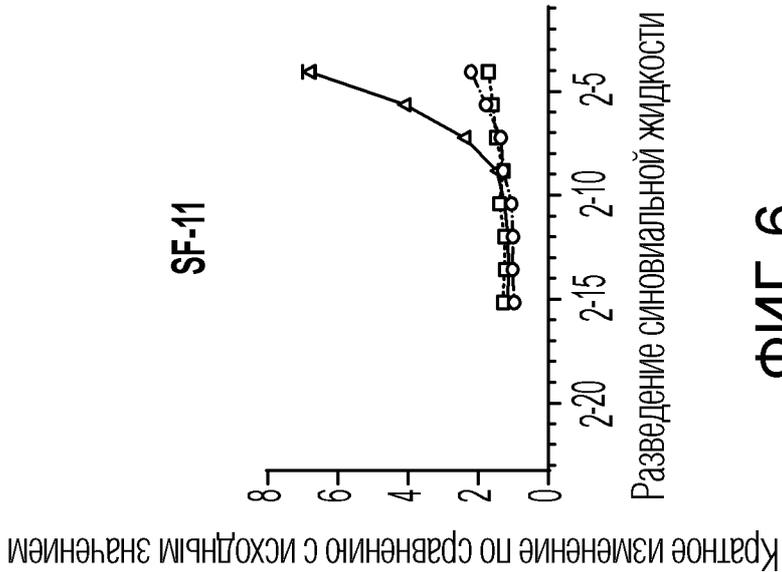
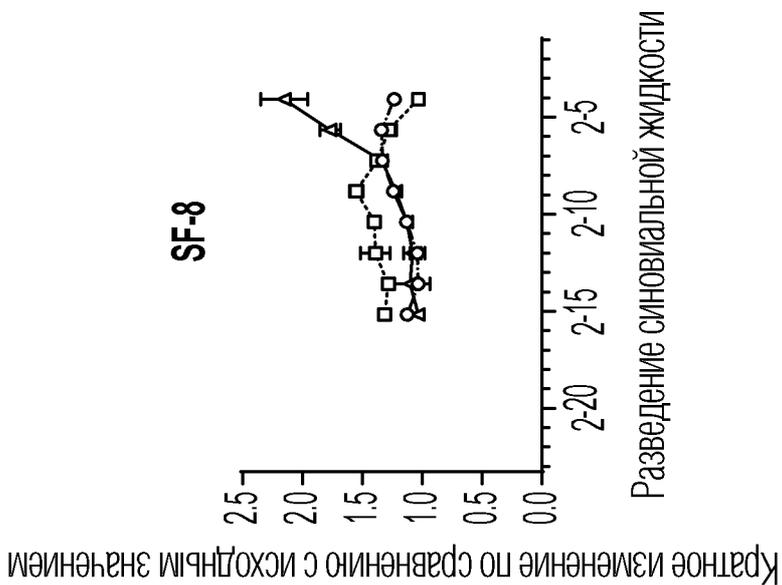
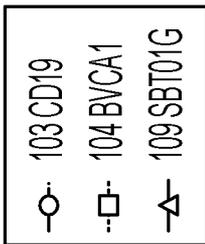
ФИГ. 5
ПРОДОЛЖЕНИЕ

Разведение синовиальной жидкости

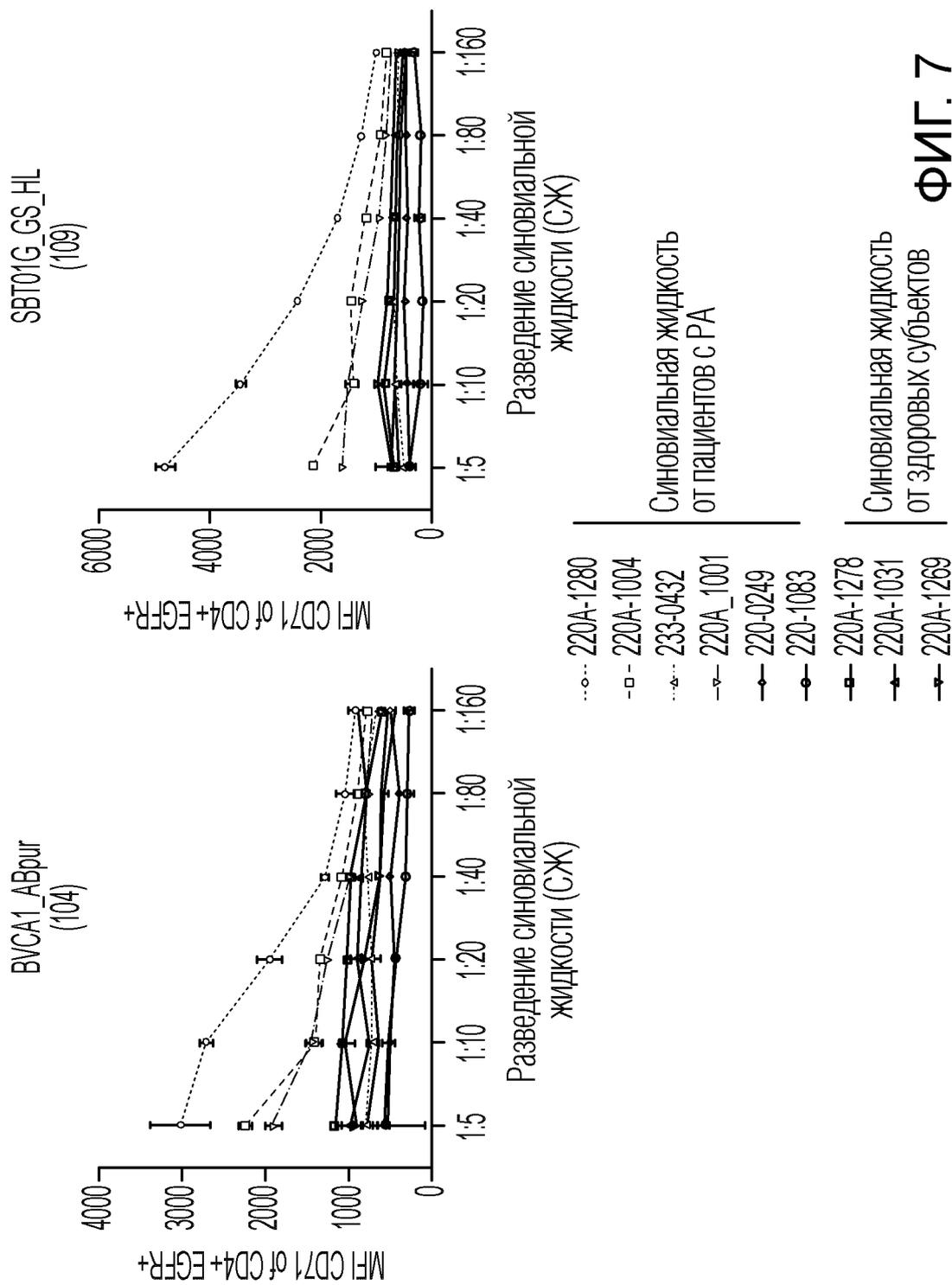
Разведение синовиальной жидкости



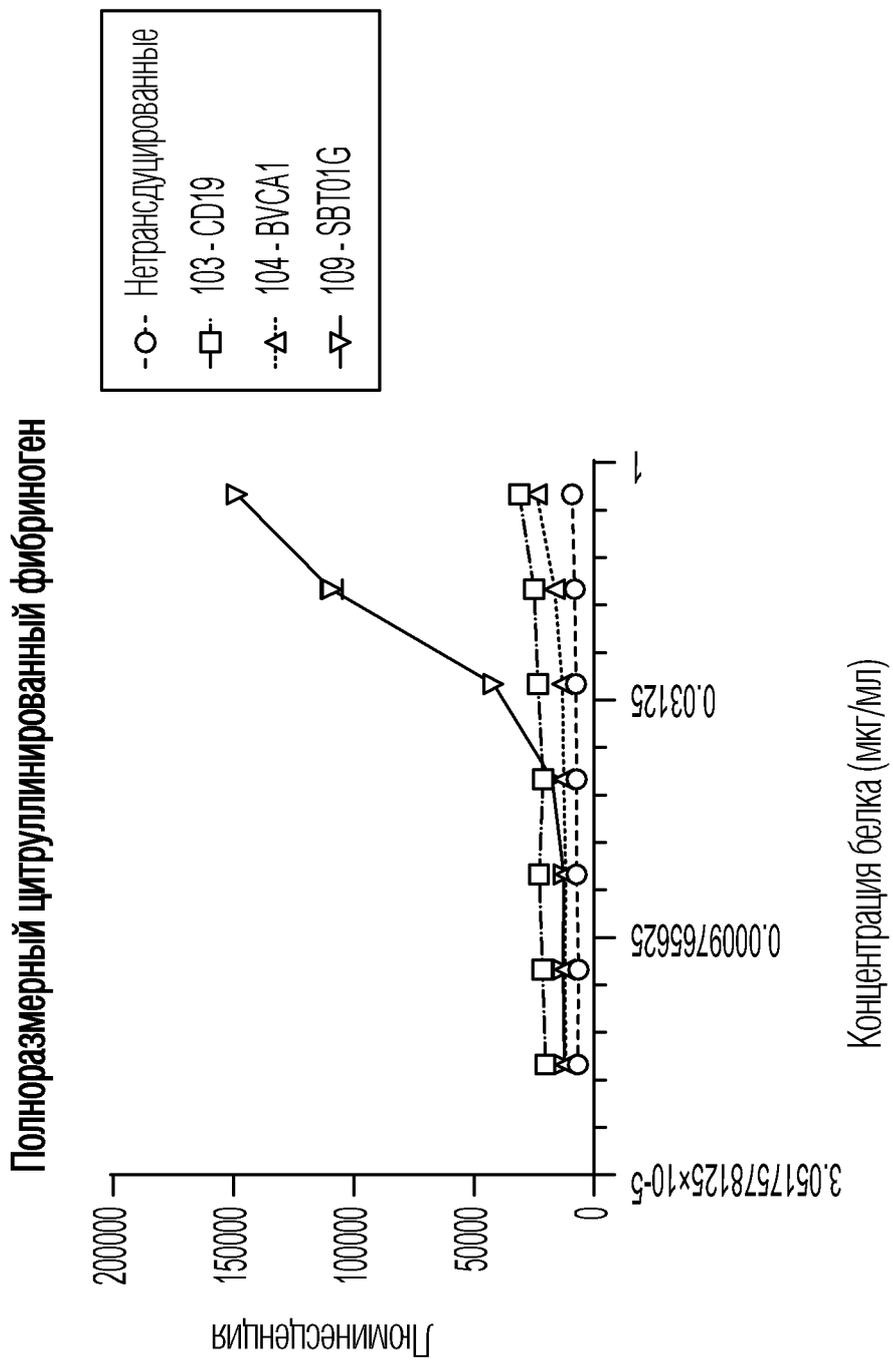
ФИГ. 6



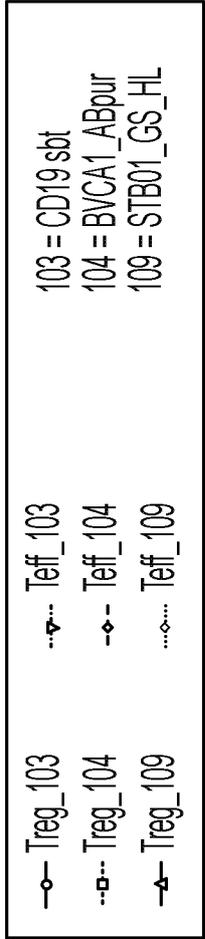
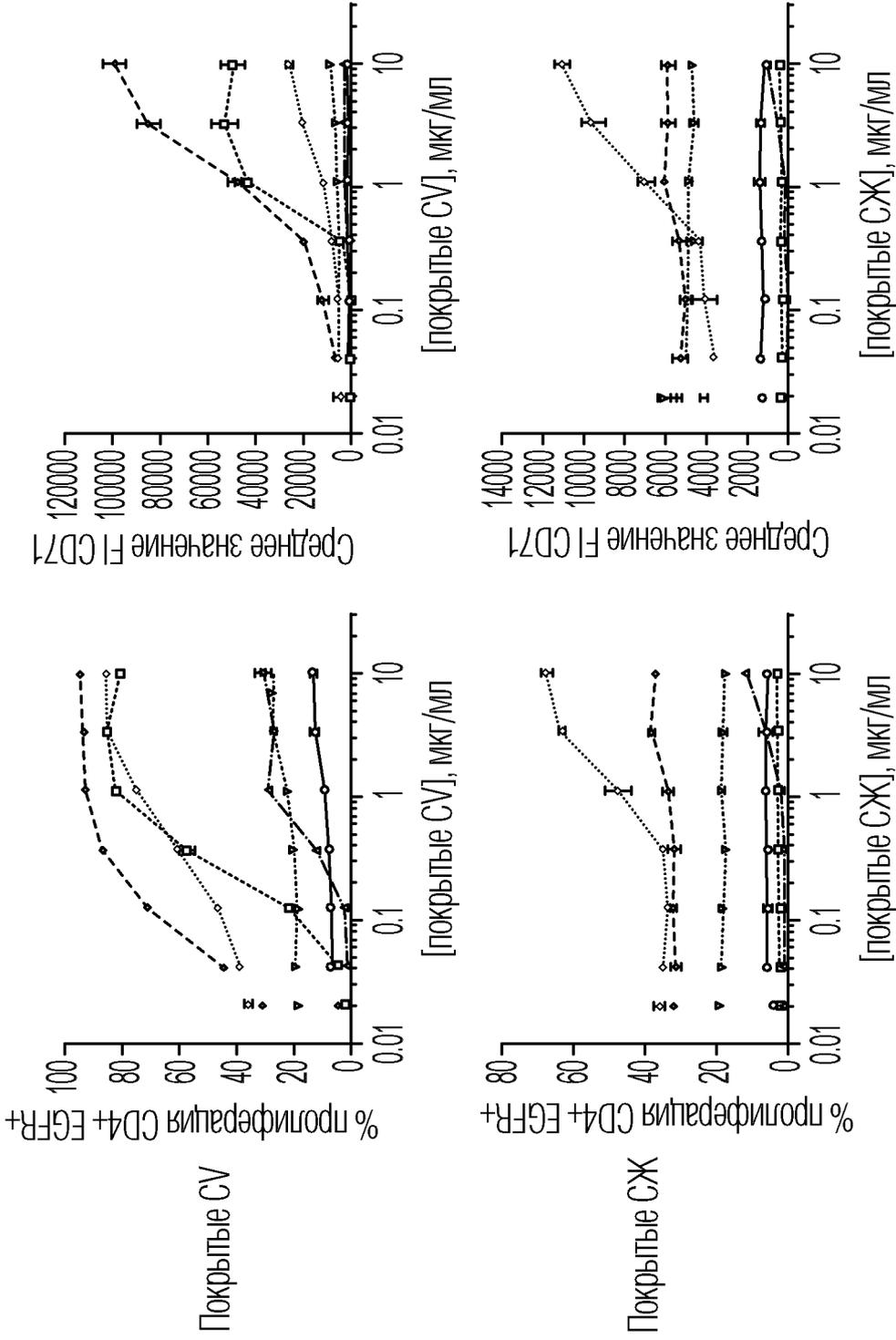
ФИГ. 6
ПРОДОЛЖЕНИЕ



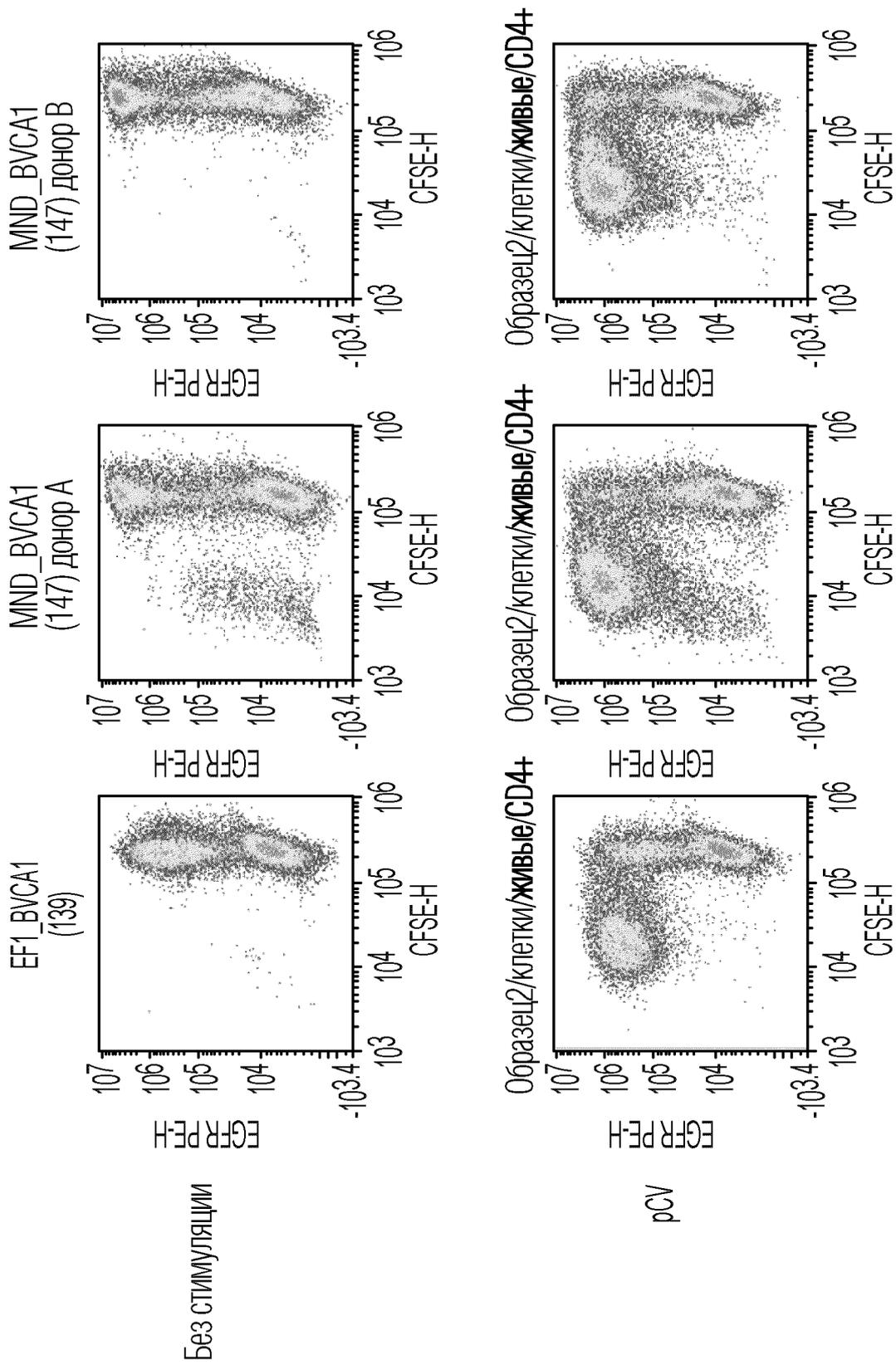
ФИГ. 7



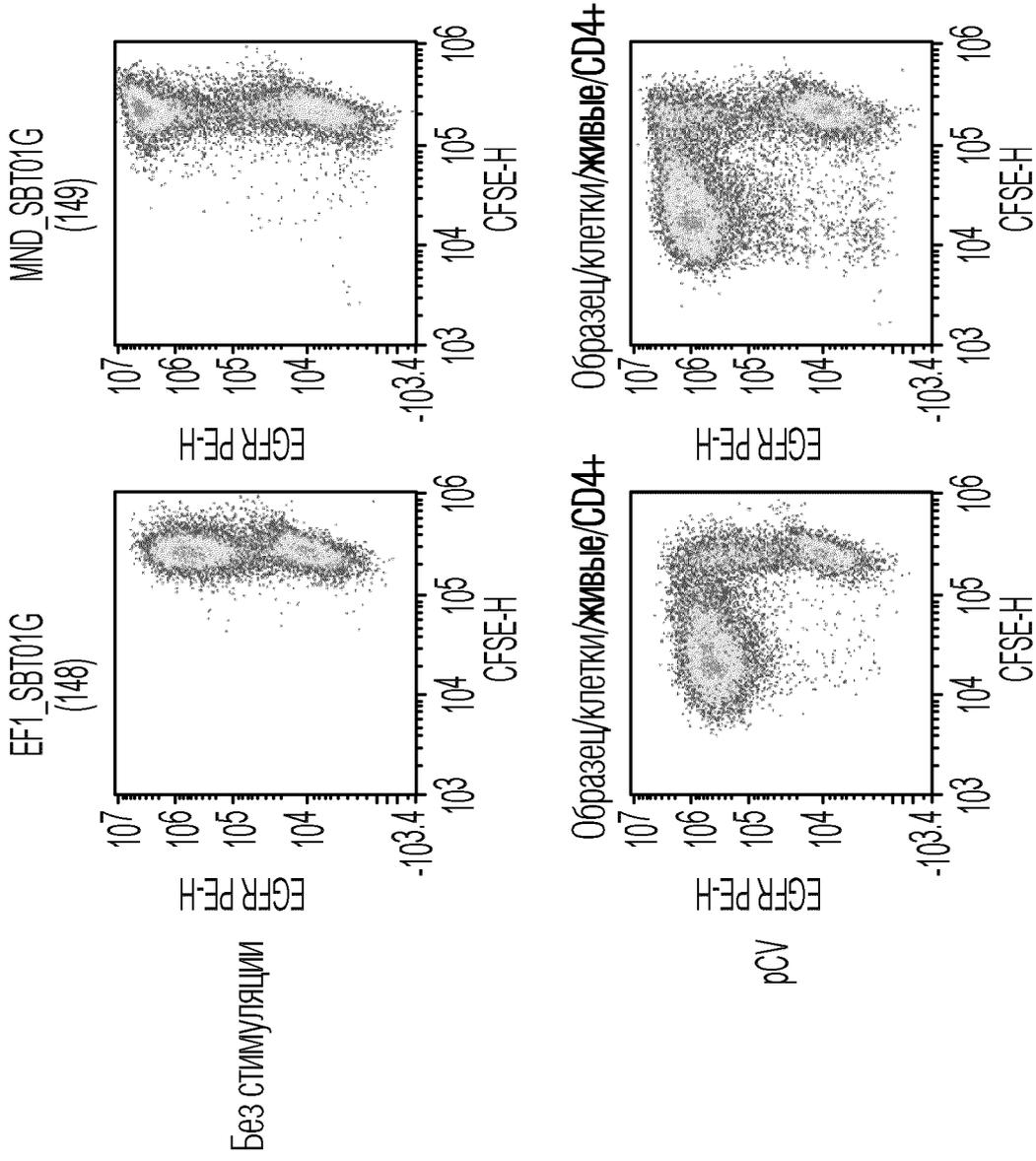
ФИГ. 8



ФИГ. 9

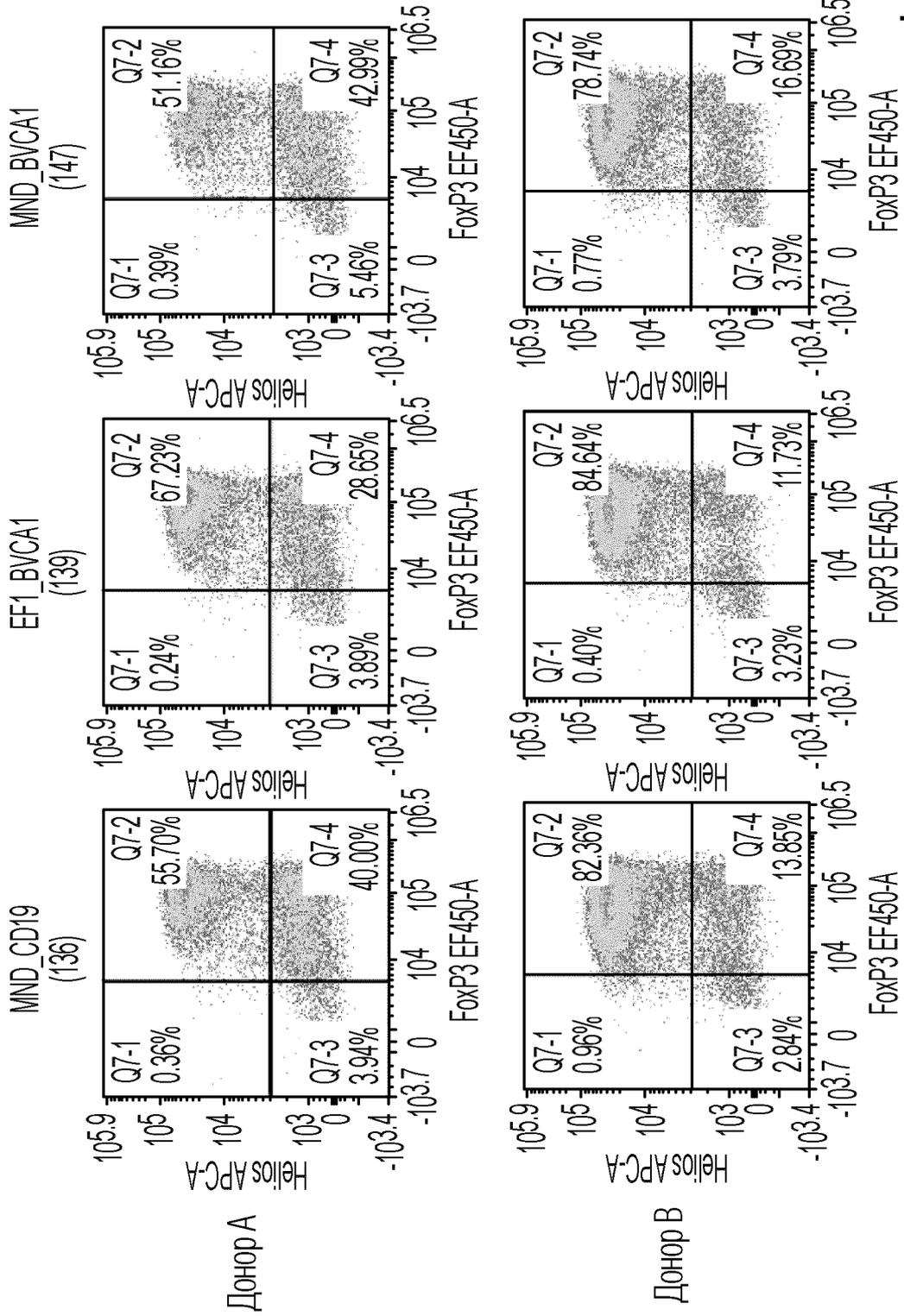


ФИГ. 10А



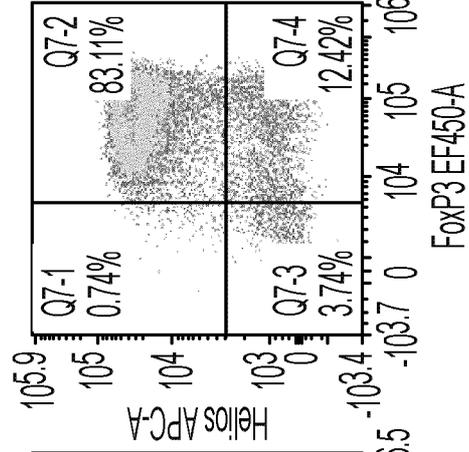
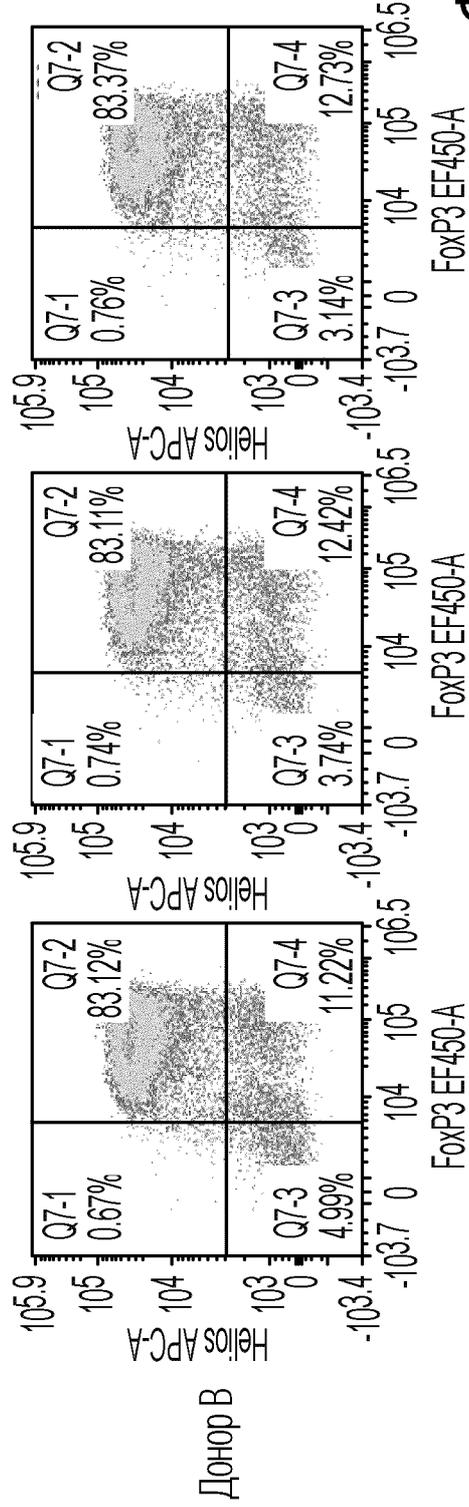
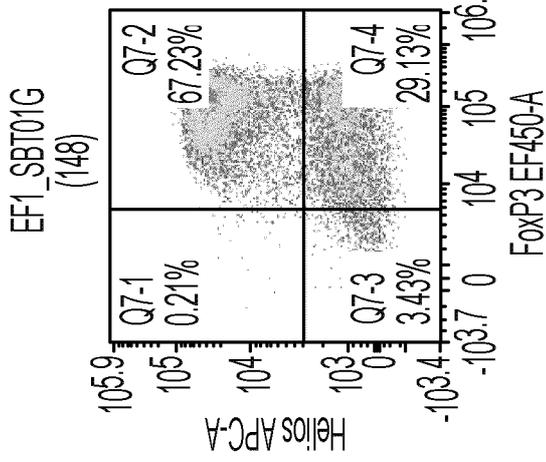
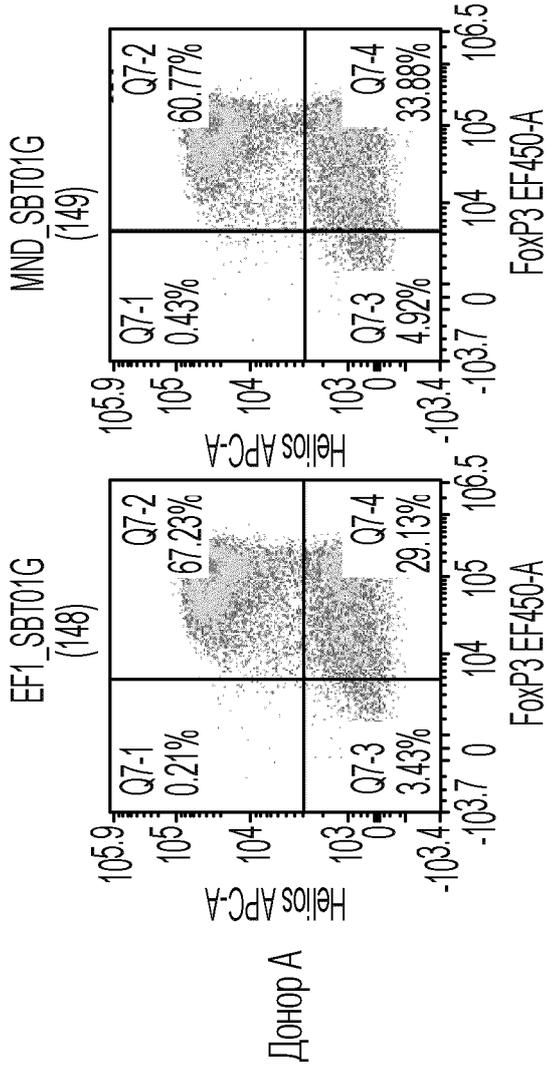
ФИГ. 10А

ПРОДОЛЖЕНИЕ



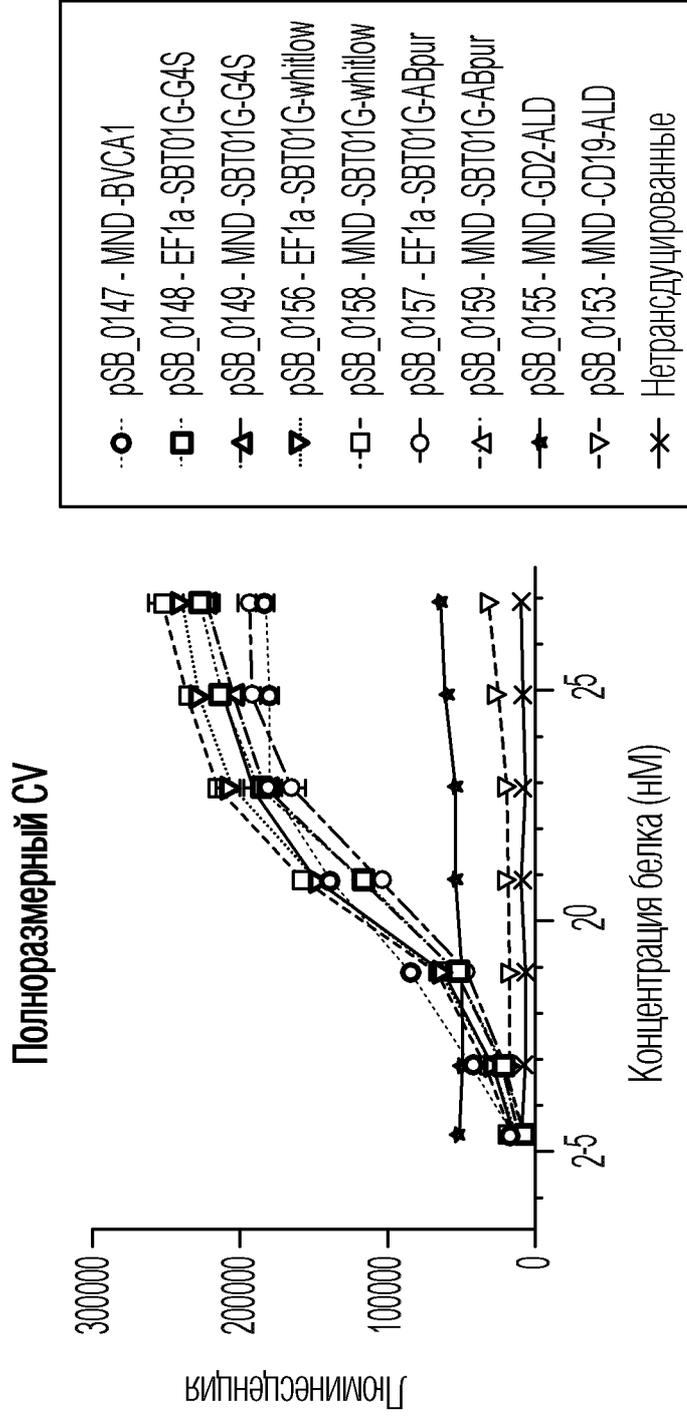
ФИГ. 10В

Нетрансдуцированные

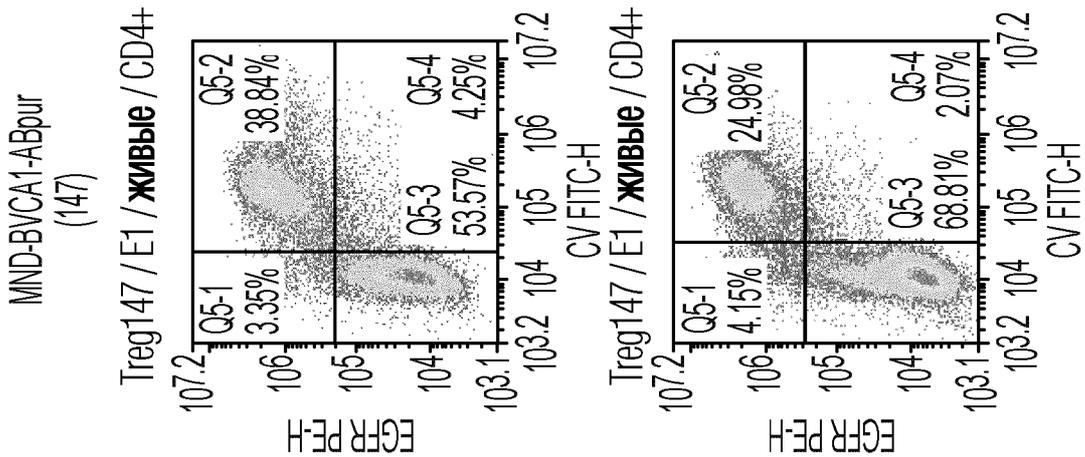
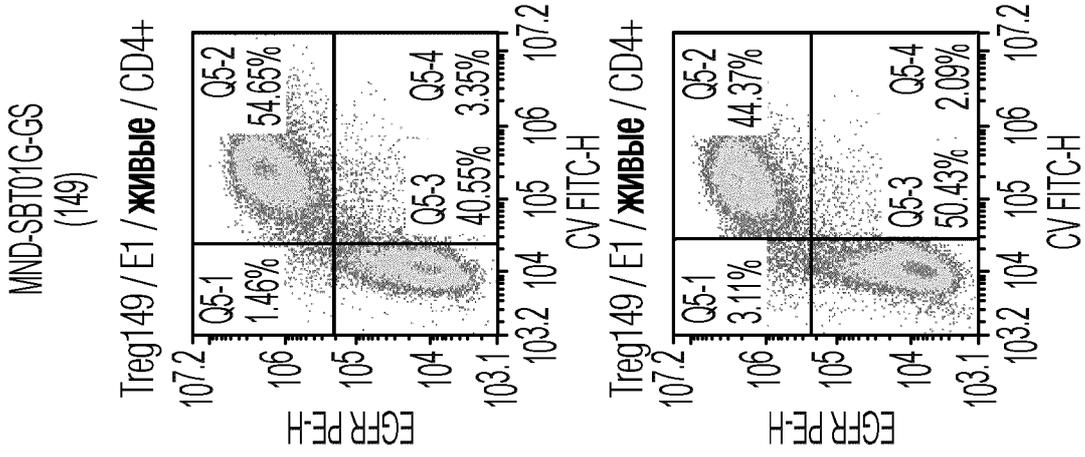
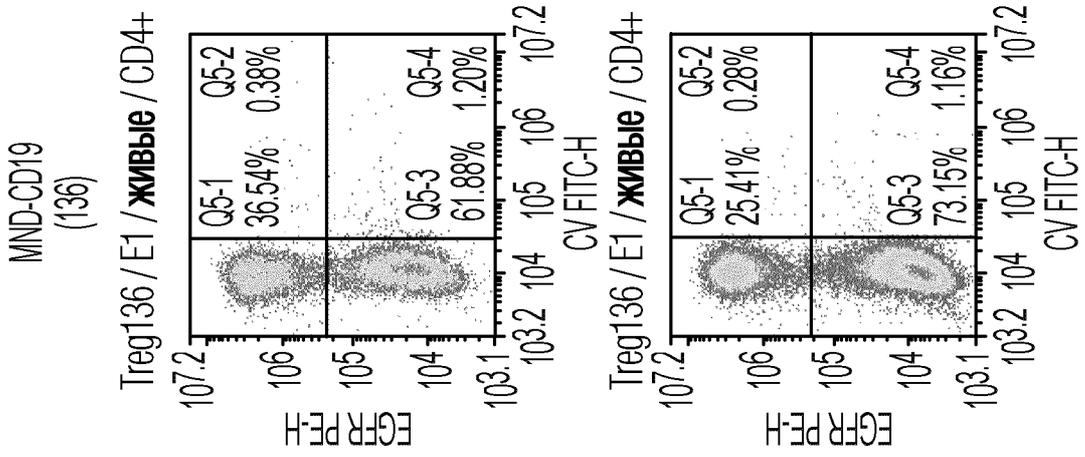


ФИГ. 10В

ПРОДОЛЖЕНИЕ

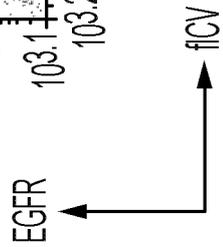


ФИГ. 11

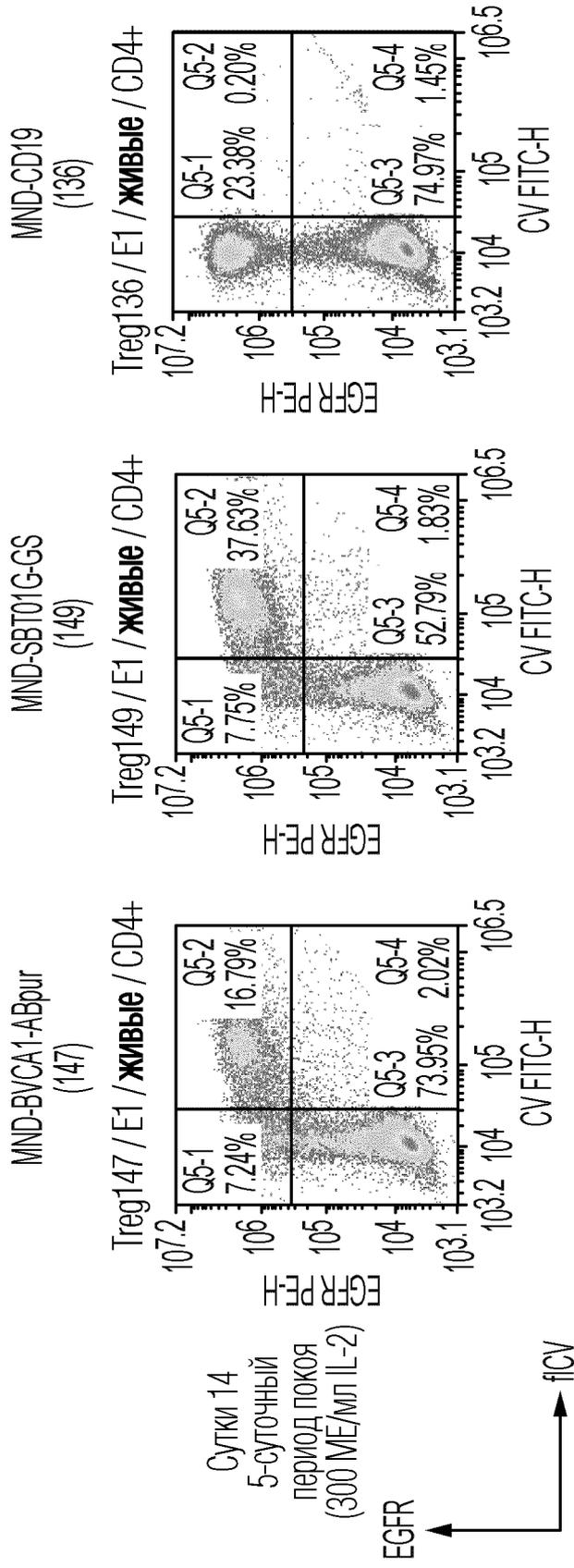


Сутки 14

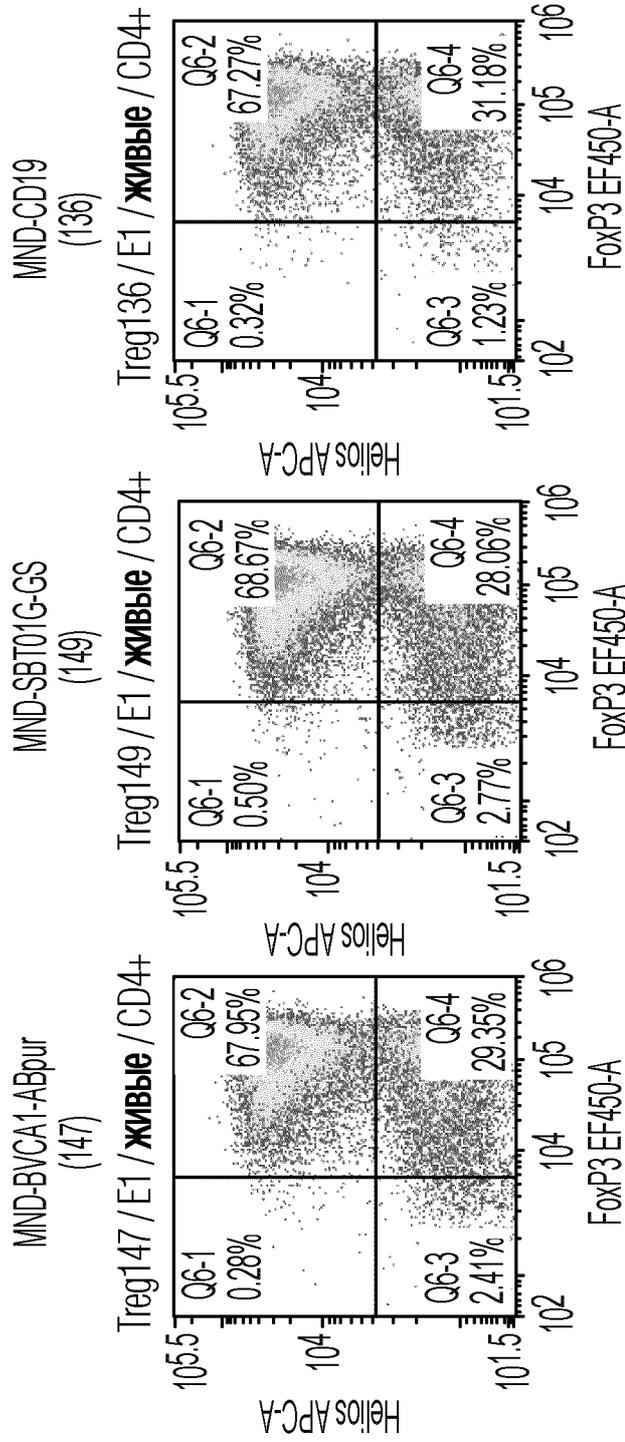
Сутки 14
2-суточный
период покоя
(300 МЕ/мл IL-2)



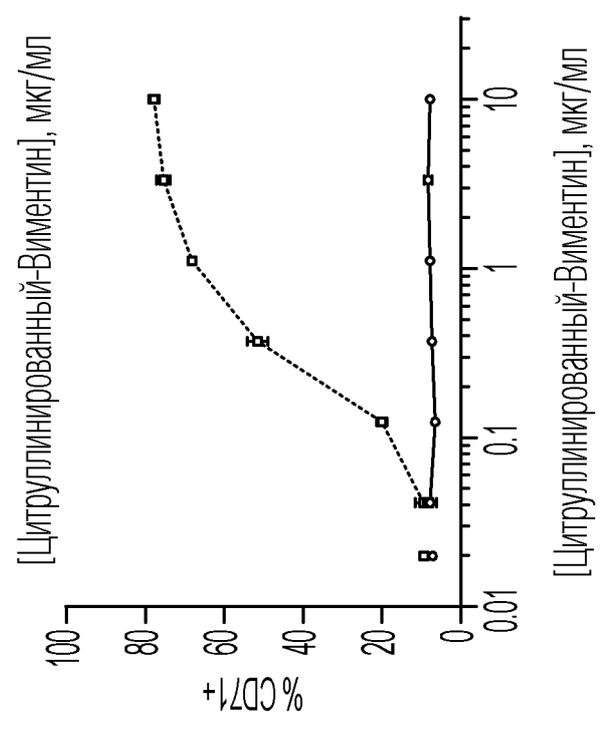
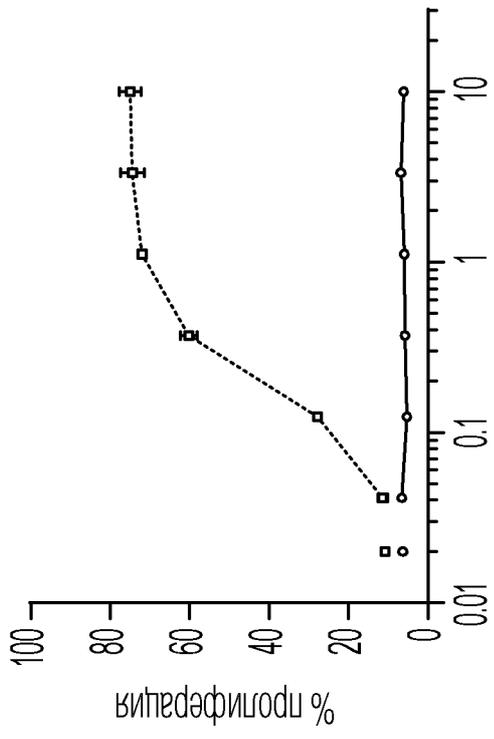
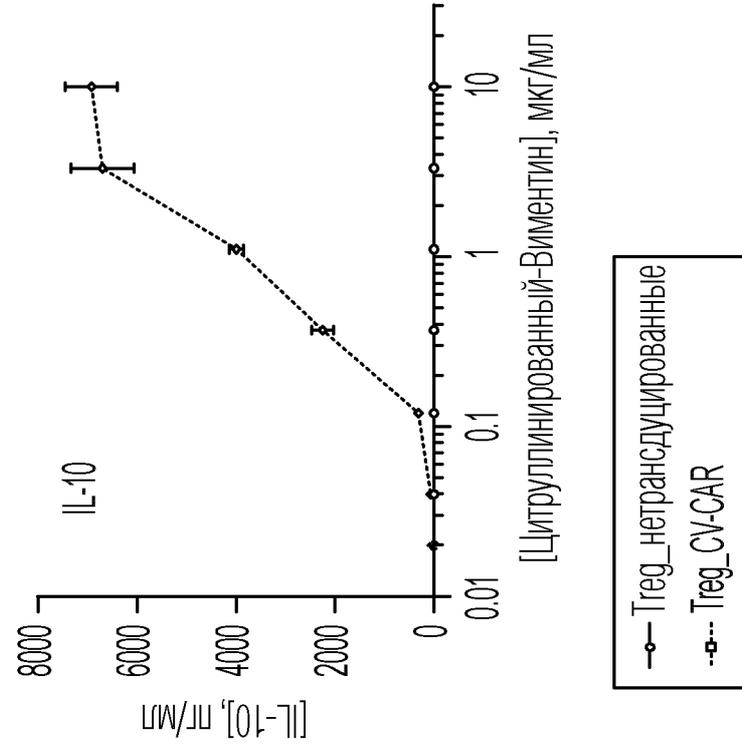
ФИГ. 12А



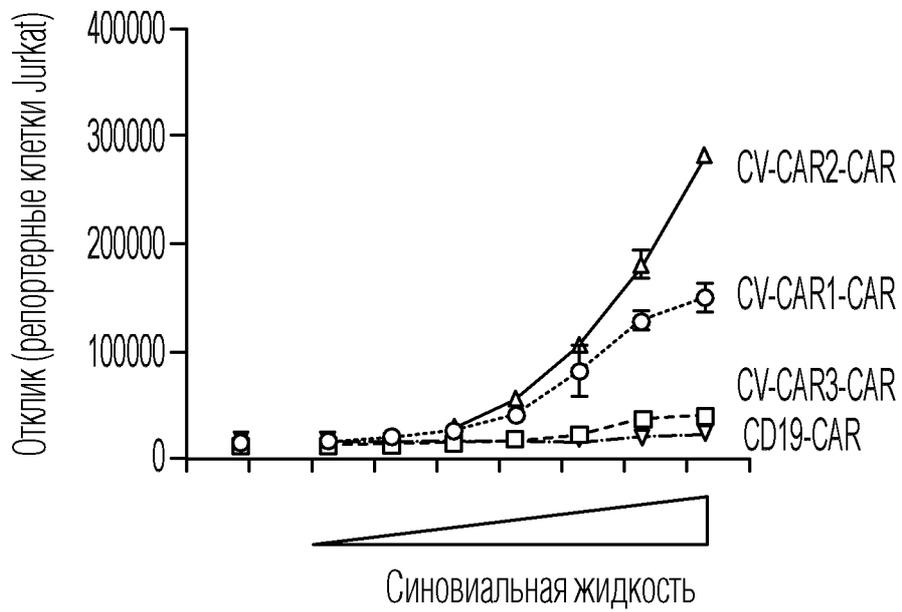
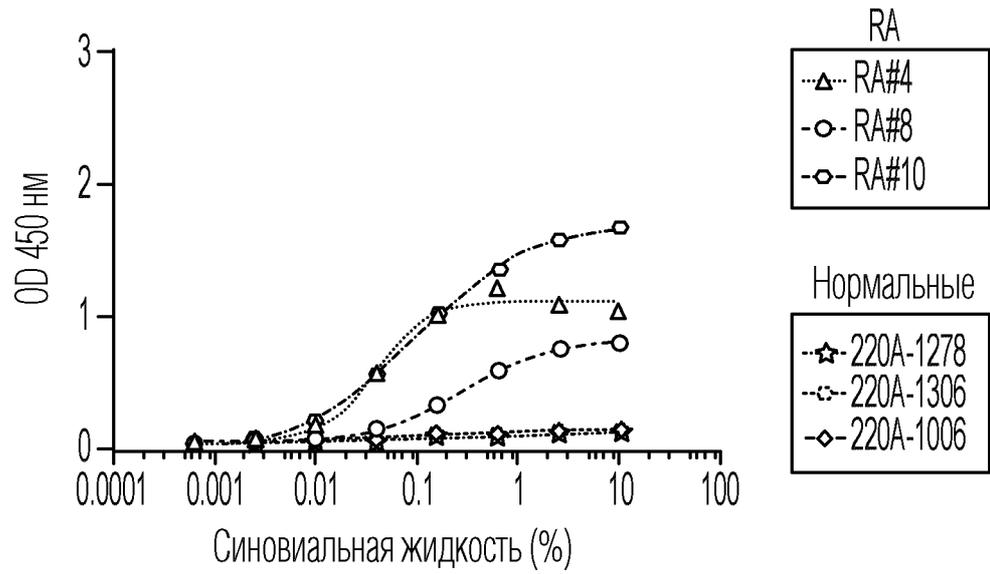
ФИГ. 12А
ПРОДОЛЖЕНИЕ



ФИГ. 12В



ФИГ. 13



ФИГ. 14

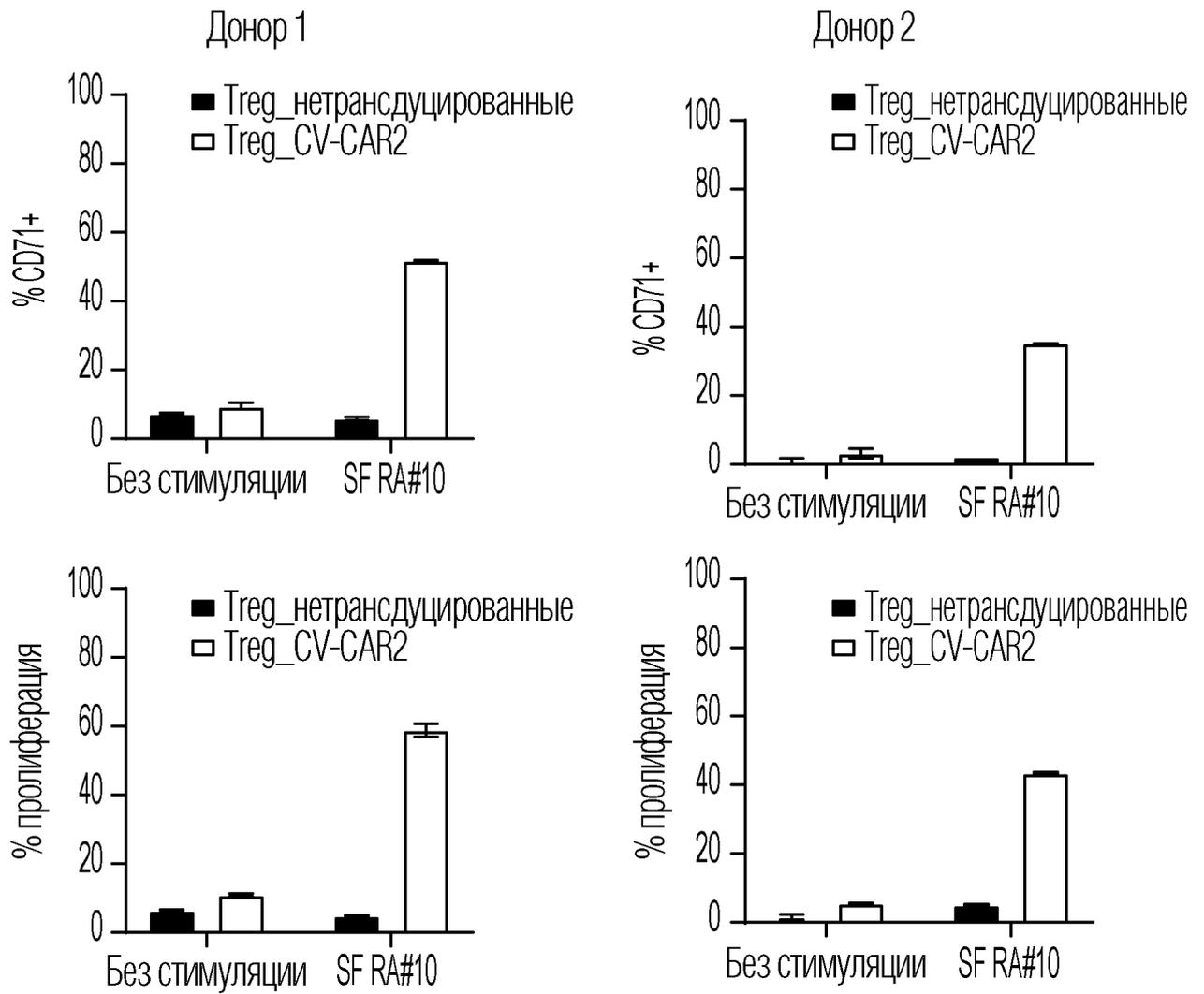
Номер образца	CV-CAR1	CV-CAR2
1280		
1004		
432		
1001		
249		
1083		
KI-1		
KI-2		
KI-3		
KI-4		
KI-5		
KI-6		
KI-7		
KI-8		
KI-9		
KI-10		
KI-11		
KI-12		
KI-13		
KI-14		
KI-15		
RA4		
RA5		
RA6		
RA7		
RA8		
RA10		



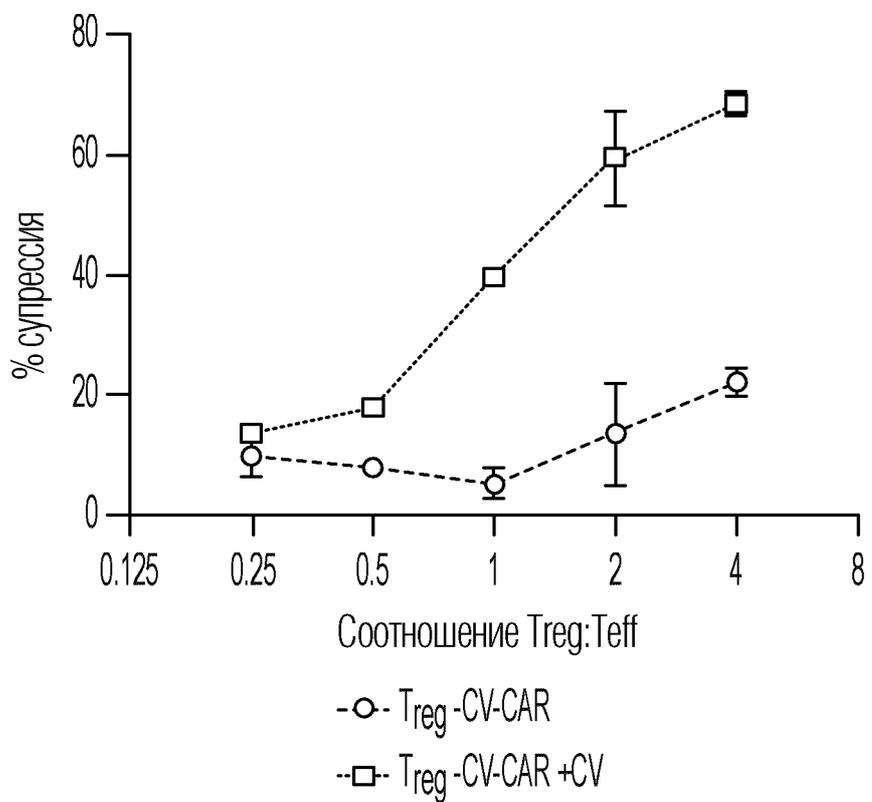
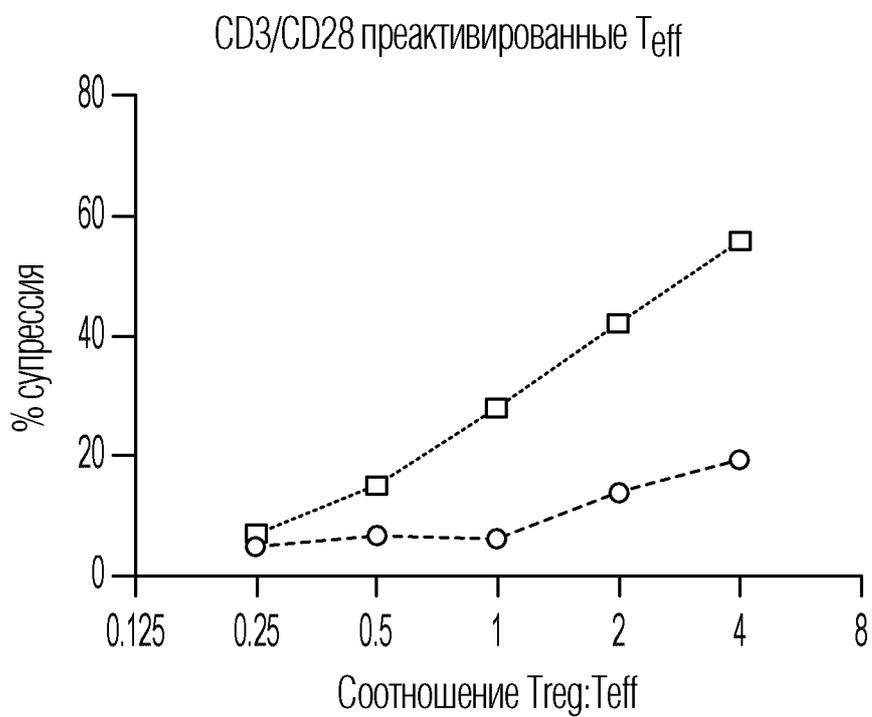
Низкий

Высокий

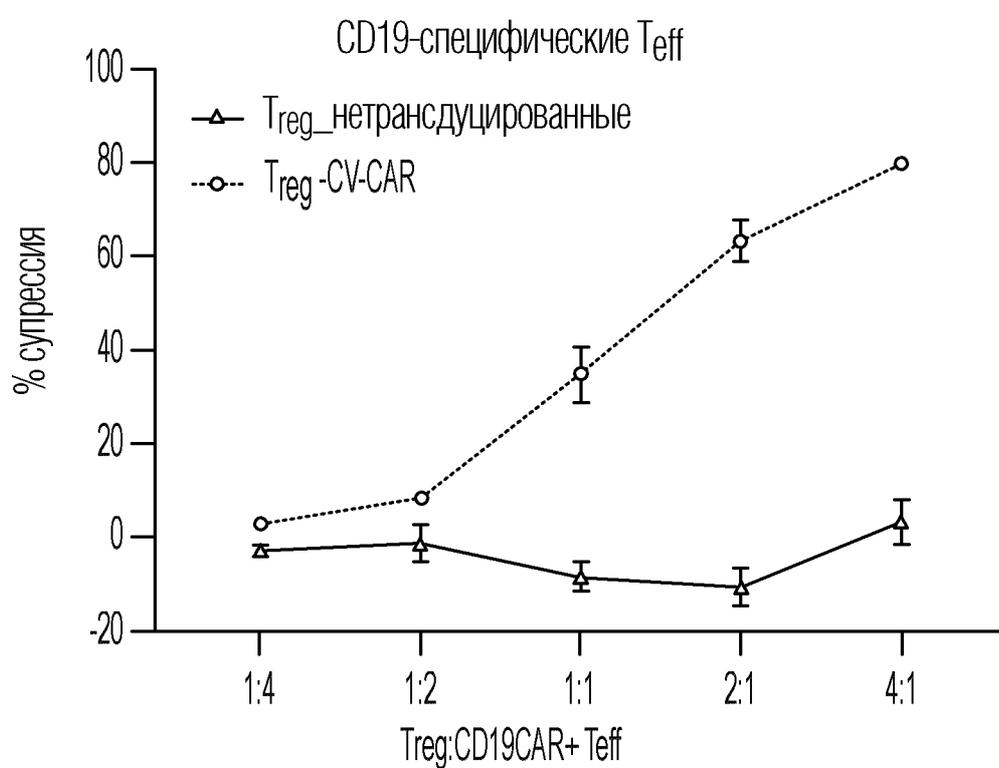
ФИГ. 14
ПРОДОЛЖЕНИЕ



ФИГ. 15



ФИГ. 16А

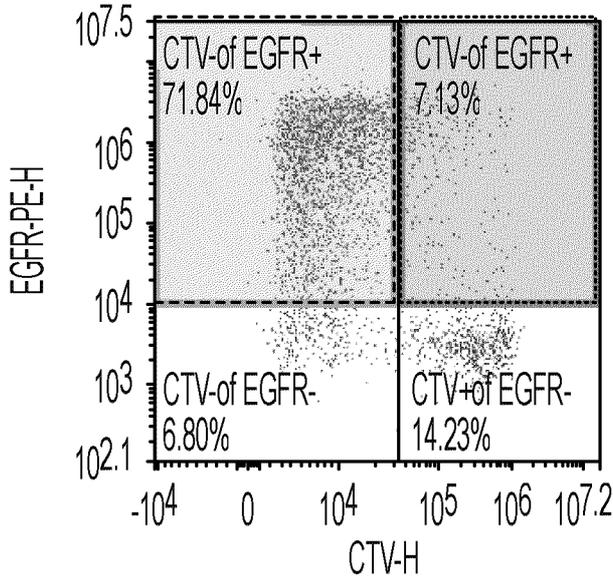


ФИГ. 16В



ФИГ. 17

Образец 8 / P1 / Единичные клетки /
живые клетки / huCD45+

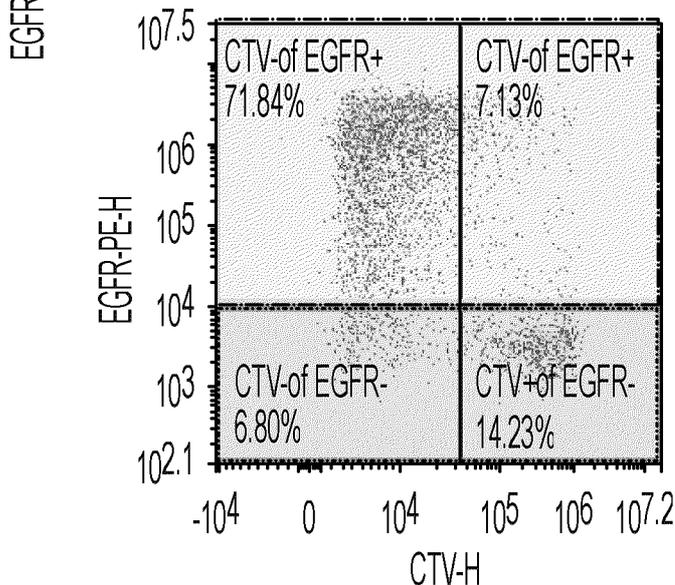


Индекс пролиферации =

$\frac{\% \text{ разбавленного CTV}}{\% \text{ неразбавленного CTV}}$

ФИГ. 18А

Образец 8 / P1 / Единичные клетки /
живые клетки / huCD45+

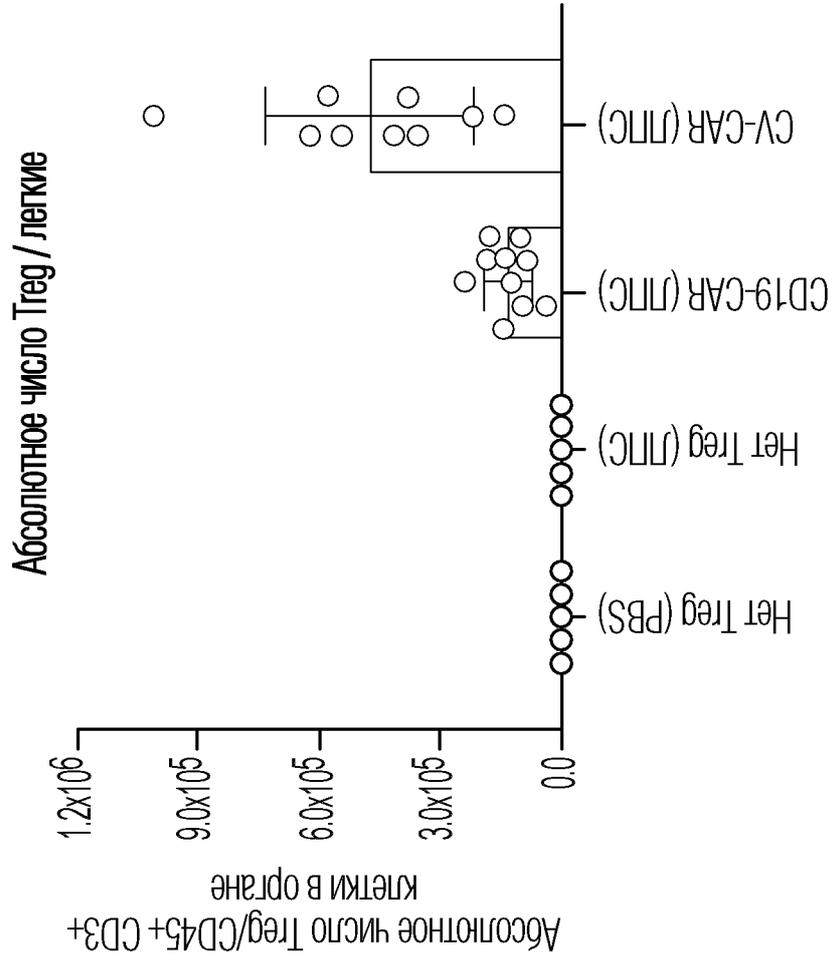


Кратное изменение соотношения
EGFR =

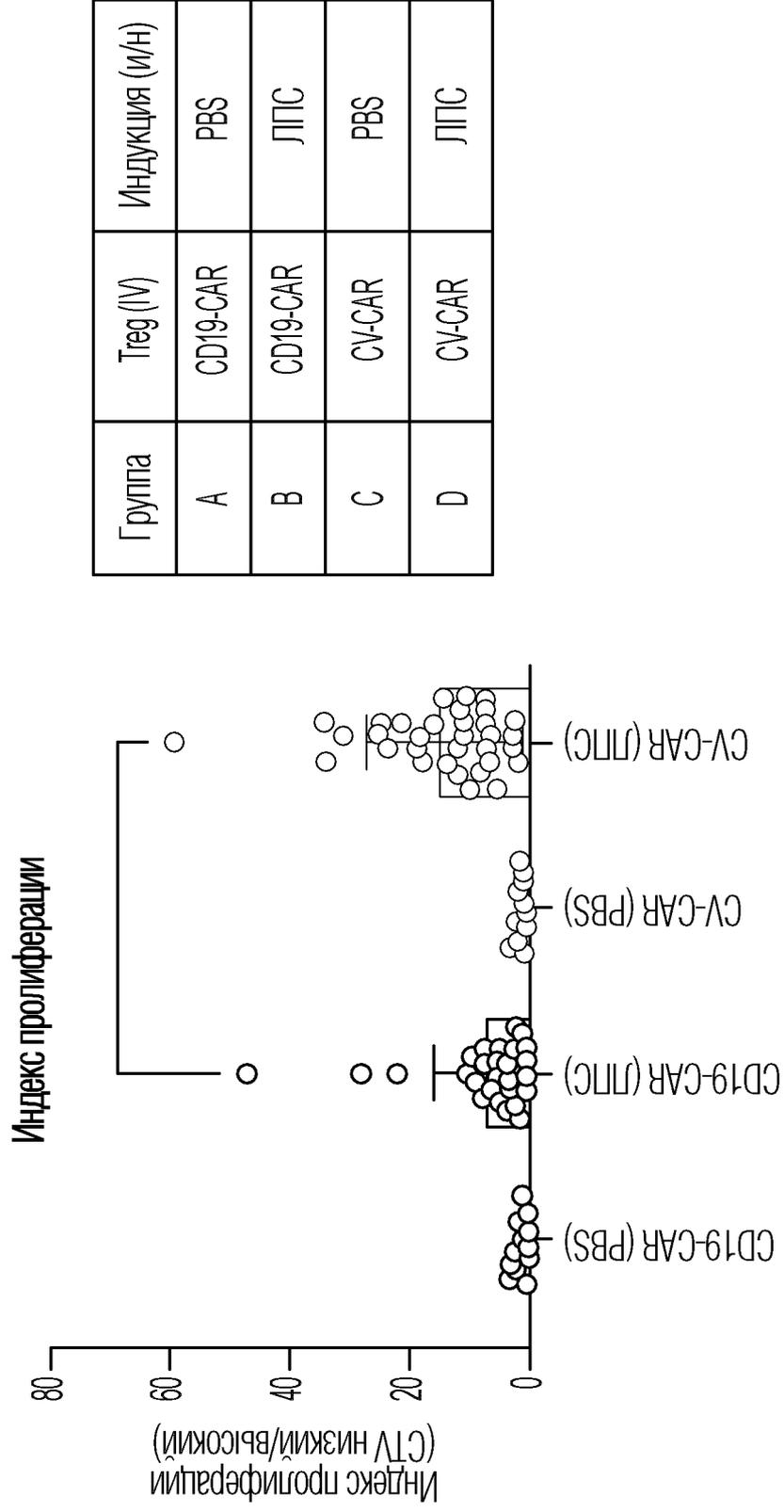
$\frac{\text{Соотношение EGFR в конце}}{\text{Соотношение EGFR при инъекции}}$
 $\left(\frac{\% \text{ EGFR}^+}{\% \text{ EGFR}^-} \right) / \left(\frac{\% \text{ EGFR}^+}{\% \text{ EGFR}^-} \right)$

Набор для оценки пролиферации клеток с
использованием метода проточной цитометрии

ФИГ. 18В



ФИГ. 19А



ФИГ. 19В