

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491706 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.25

(22) Дата подачи заявки
2022.12.29

(51) Int. Cl. C12N 5/0783 (2010.01)
C07K 14/73 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(54) НАЦЕЛЕННЫЕ НА ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ ХИМЕРНЫЕ
АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ

(31) 202111666522.1; 202210350268.2

(32) 2021.12.31; 2022.04.02

(33) CN

(86) PCT/CN2022/143440

(87) WO 2023/125822 2023.07.06

(71) Заявитель:

БЕЙДЖИНГ СОЛОБИО
ДЖИНТЕКНОЛОДЖИ КО., ЛТД.
(CN)

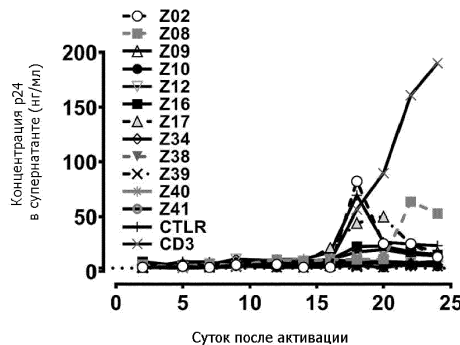
(72) Изобретатель:

Чжу Вейцзюн, Ван Хунвэй, Ян Ин,
Фань Цзюнди (CN)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Один аспект изобретения относится к рекомбинантной клетке, включающей химерный антигенный рецептор и кшРНК, нацеленную на ингибирование жизненного цикла ВИЧ. Другой аспект изобретения относится к химерной молекуле антигена, внеклеточную область которой получают из внеклеточной области, или она включает внеклеточную область человеческой молекулы CD4, трансмембранную область которой получают из трансмембранного домена CD8 α , или она включает его, и рекомбинантной клетке, включающей вышеуказанную химерную молекулу антигена. Вышеуказанная рекомбинантная клетка может быть применена для лечения ВИЧ-инфекции и имеет более высокую комплексную эффективность в отношении уничтожения клеток, более длительное время действия и меньший риск возникновения цитокинового шторма в среде ВИЧ-инфекции.



A1

202491706

202491706

A1

НАЦЕЛЕННЫЕ НА ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящая заявка относится к области техники иммунотерапии инфекционных заболеваний, в особенности, к сконструированной иммунной эффекторной клетке для иммунотерапии ВИЧ.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

СПИД, также известный как синдром приобретенного иммунодефицита, представляет собой серьезное инфекционное заболевание, угрожающее жизни человека, которое вызывается вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). ВИЧ – это вирус, который может поражать иммунную систему человека. ВИЧ в основном атакует и разрушает CD4-положительные Т-лимфоциты в иммунной системе человека, лишая организм человека иммунной функции и делая его легко подверженным развитию различных заболеваний или даже злокачественных опухолей, с относительно высоким уровнем смертности. К концу 2019 года около 38 миллионов человек в мире были инфицированы ВИЧ, около 1,7 миллиона человек были впервые инфицированы и 680 тысяч человек умерли из-за ВИЧ (UNAIDS/WHO) в текущем году. Прошло 40 лет с тех пор, как был диагностирован первый человек со СПИД, в то время как СПИД по-прежнему остается важной проблемой общественного здравоохранения, которая серьезно угрожает общественному здоровью.

В настоящее время в мире нет эффективных вакцин против СПИД. В основном в клиническом лечении применяют высокоактивную антиретровирусную терапию (HAART), обычно известную как «коктейльная терапия» и также известную как антиретровирусная терапия (ART). К концу 2017 года почти 21,7 миллиона человек получили ART (UNAIDS/WHO). Текущее лечение ART не устраняет вирусный резервуар ВИЧ-1, и всем пациентам требуется пожизненное лечение. После прекращения лечения вирус в вирусном резервуаре может реактивироваться и реплицироваться, что приводит к быстрому возвращению болезни, поэтому пациентам необходимо принимать лекарства постоянно.

На сегодняшний день подтверждено излечение только двух пациентов в мире: «берлинского пациента» и «лондонского пациента». Оба они были вылечены путем пересадки костного мозга от доноров, у которых отсутствуют нормальные гены рецепторов (CCR5), необходимые для инфицирования клеток большинством штаммов ВИЧ. Однако уровень смертности от самой трансплантации костного мозга высок, и для большинства людей подходящий костный мозг с такими генетическими особенностями

едва ли существует, что препятствует широкому применению этого способа в клинической практике.

ART превращает ВИЧ-инфекцию в хроническую инфекцию. В настоящее время неудовлетворенные клинические потребности в основном включают долгосрочные, более безопасные и переносимые терапевтические решения. Около 10% пациентов, устойчивых к ART, нуждаются в лечении с новым механизмом. Для достижения функционального излечения и даже очистки резервуара с целью его ликвидации необходимы способы лечения, направленные против вирусного резервуара.

Для достижения функционального излечения можно применять нейтрализующие антитела широкого спектра действия, на основе антител можно также разработать мультиспецифические молекулы, а Т-клетки можно модифицировать, применяя химерные антигенные рецепторы (CAR). Помимо непосредственной нейтрализации вирусов, нейтрализующие антитела широкого спектра действия могут также очищать презентующие вирусные белки клетки путем связывания макрофагов, NK-клеток и CD8⁺ Т-клеток с Fc. Например, для gp120 было создано много нейтрализующих антител широкого спектра действия, включая 3BNC117 (Scheid et al., Science, 2011). Однако многие штаммы вирусов выработали резистентность к этим антителам, и для оптимальной клинической эффективности эту резистентность необходимо преодолевать (Qian Wang et al., Front Med., 2020, Feb;14(1):30-42). С другой стороны, на основе нейтрализующих антител широкого спектра действия или вирусных рецепторов клетки CAR-T могут быть напрямую модифицированы для специфического распознавания вирусов и способны лизировать ВИЧ-инфицированные клетки как *in vivo*, так и *in vitro*. В настоящее время в Китае проводят два клинических испытания на основе третьего поколения CAR-T с применением нейтрализующих антител широкого спектра действия. Одно из испытаний представляет собой сотрудничество между Восьмой народной больницей Гуанчжоу и Университетом Сунь Ятсена, которое связано с модификацией Т-клеток CD8⁺ на основе VRC01 для эффективного лечения пациентов (NCT03240328; Liu et al., J Clin. Invest., 2021); другой пример – это сотрудничество между Ухань Юньгу и больницей Ухань Цзиньинтань, которое основано на N6 и комбинируется с лечением HAART для недавно прошедших лечение пациентов (ChiCTR-OPN-17013068). Результаты, раскрытые NCT0340328, показывают, что применение CAR-T безопасно, однако в течение периода наблюдения в 6 месяцев нагрузка ВИЧ у пациентов восстановилась примерно через 5,3 недели в среднем после прекращения лечения HAART, и после восстановления все вирусы избегают нейтрализующего антитела VRC01. Официальные результаты клинического испытания CAR-T на основе N6 не раскрыты.

Другая идея лечения СПИД заключается в реактивации латентного ВИЧ, что в сочетании с способом усиления специфического для ВИЧ иммунитета в организме может восстановить иммунный ущерб, вызванный ВИЧ, и улучшить очищение резервуара ВИЧ. В начале 1994 года Roberts et al. попытались лечить ВИЧ-инфекцию с помощью CAR-T-клеток, в которых полная последовательность CD4 была выбрана в качестве антиген-специфического домена распознавания для связывания с белком оболочки gp120 на поверхности ВИЧ-инфицированных клеток. Хотя CAR-T-клетки частично выполняли функцию уничтожения инфицированных клеток, однако после многих лет усилий это в конечном итоге закончилось неудачей. Причина заключалась, с одной стороны, в том, что специфическая активность в отношении уничтожения клеток CAR-T-клеток нуждалась в дальнейшем улучшении, с другой стороны, в том, что CAR-T-клетки также были восприимчивы к ВИЧ-инфекции и легко истощались в среде, инфицированной ВИЧ, что сократило продолжительность эффективности.

Когда ВИЧ заражает клетки, гликопротеин оболочки вируса gp120 сначала связывается с молекулой CD4 на поверхности клетки, а затем связывается со вспомогательным рецептором CCR5 или CXCR4 или им подобными, что тем самым опосредует проникновение вирусного ядра в клетку. CD4 на поверхности клетки представляет собой основную мишень для связывания gp120, и они имеют очень высокое аффинность связывания друг с другом. Константа диссоциации K_d CD4 и нескольких gp120 составляет от $2,2 \times 10^{-8}$ до 8×10^{-10} М (Lasky et al., Cell, 1987; Zhang et al., Biochemistry, 2000; Myszka et al., PNAS, 2000). Для сравнения, константа диссоциации K_d для CD4 или CD8 с конкретным комплексом МНС-полипептид составляет всего от 10^{-4} до 10^{-6} М (ZeNan L. Chang and Yvonne Y. Chen, Trends in Molecular Medicine, 2017). Более того, сродство CD4 к нескольким типичным gp120 ВИЧ-1 (например, AC10.29, применяющему CCR5 в качестве вспомогательного рецептора, NL4-3, применяющему CCR5 в качестве вспомогательного рецептора, и SF162, способному применять два вспомогательных рецептора одновременно) не слабее, чем сродство scFv из типичных нейтрализующих антител широкого спектра действия (3BNC117) к этим типичным gp120 ВИЧ-1 (Scheid et al., Science, 2011; van Dorsten et al. J. Viral., 2020).

American Gene Technologies (AGT) и другие компании применили кшРНК для CCR5 и объединили ее с двумя или несколькими кшРНК для ВИЧ, что продемонстрировало хороший эффект *in vitro*. AGT рассчитывает индуцировать ВИЧ-специфические клетки CD4 путем предварительной полипептидной иммунизации *in vivo*, ввести кшРНК в клетки *in vitro*, а затем реинфузировать их обратно *in vivo*, ожидая *in vivo* пролиферации защищенных клеток CD4, которые составляли около 0,3% от общего числа

клеток CD4 человеческого организма. Клинические испытания этого проекта продолжаются, но только один участник был реинфузирован. Однако результата пока нет.

В настоящее время все еще необходимы активные меры для достижения функционального излечения от СПИД и даже очистки латентного резервуара, а в конечном итоге и для достижения полной ликвидации и излечения.

РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для дальнейшего улучшения способа клеточной терапии (например, CAR-T-клеток) для ВИЧ-инфекции в одном аспекте настоящая заявка обеспечивает рекомбинантную клетку (например, CAR-T-клетки), которая обладает более сильной активностью уничтожения ВИЧ-инфицированных клеток, сохраняется в течение более длительного периода времени в ВИЧ-инфицированной среде и имеет более длительную продолжительность эффективности. В другом аспекте настоящая заявка также обеспечивает химерный антигенный рецептор (CAR) для ВИЧ, клетку, включающую химерный антигенный рецептор, который обладает эффективной и специфической активностью уничтожения ВИЧ-инфицированных клеток, и комбинацию CAR и, по меньшей мере, одну кшРНК/нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК/вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК. Кроме того, рекомбинантная клетка или клетка, включающая химерный антигенный рецептор, обеспеченная настоящей заявкой, не может легко вызвать цитокиновый шторм.

В одном аспекте настоящая заявка относится к рекомбинантной клетке, в особенности:

1. Рекомбинантной клетке, включающей следующую функциональную структуру:

1) химерный антигенный рецептор (CAR) или кодирующую его нуклеиновую кислоту, в которых CAR включает внеклеточную область, трансмембранную область и внутриклеточную область, причем внеклеточная область может специфически связываться с белком gp120 ВИЧ.

2) по меньшей мере, одну короткую шпилечную РНК (кшРНК) или кодирующую ее нуклеиновую кислоту, в которой кшРНК нацелена на один или несколько генов хозяина или генов ВИЧ, участвующих в жизненном цикле ВИЧ, выбранных из группы, состоящей из NF-κB, CCR5, TSG 101, CXCR4, P-TEFb, tat, rev, nef, env, LTR и gag.

В некоторых воплощениях, рекомбинантные клетки получают от человека или приматов. В других воплощениях рекомбинантные клетки получают от пациентов, инфицированных ВИЧ, или от здоровой популяции. В некоторых воплощениях рекомбинантные клетки получают из клеток рецепторов ВИЧ или мононуклеарных клеток периферической крови. В дополнительном предпочтительном воплощении настоящего

изобретения, рекомбинантные клетки получают из лимфоцитов. В некоторых воплощениях, рекомбинантные клетки получают из Т-клеток. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из наивных Т-клеток, Т-клеток памяти или эффекторных Т-клеток. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из цитотоксических Т-клеток, Т-хелперных клеток или регуляторных Т-клеток. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из CD4⁺ Т-клеток или CD8⁺ Т-клеток. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из НКТ-клеток. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из $\gamma\delta$ Т-клеток. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из НК-клеток. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из антигенпрезентирующих клеток, таких как макрофаги и дендритные клетки.

В дополнительном предпочтительном воплощении настоящего изобретения, рекомбинантные клетки получают из клеток-предшественников или стволовых клеток. В некоторых воплощениях настоящего изобретения, клетки-предшественники или стволовые клетки включают гемопоэтические стволовые клетки (например, клетки CD34⁺) или гемопоэтические клетки-предшественники. В других воплощениях настоящего изобретения, стволовые клетки включают стволовые Т-клетки памяти, такие как центральные Т-клетки памяти, эффекторные Т-клетки памяти или стволовые Т-клетки памяти. В другом воплощении изобретения, стволовые клетки индуцируют для дифференциации в любую из Т-клеток, как описано ранее.

В некоторых воплощениях, рекомбинантные клетки получают от пациентов, инфицированных ВИЧ. В некоторых воплощениях, рекомбинантные клетки получают от здоровой популяции.

2. Рекомбинантной клетке по п. 1, в которой кшРНК нацелена на ген gag ВИЧ и ген LTR. В некоторых воплощениях кшРНК нацелена на ген gag ВИЧ и ген nef.

3. Рекомбинантной клетке по п. 1 или 2, в которой последовательность нуклеиновой кислоты кшРНК включает последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 5 и/или 6 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 1, 2, 5 и/или 6.

В некоторых воплощениях, промотор, применяемый при экспрессии SEQ ID NO: 1 и 2, представляет собой сильный промотор, такой как промотор H1 и промотор U6. В некоторых воплощениях при экспрессии SEQ ID NO: 1 и 2 применяют один и тот же промотор. В некоторых воплощениях при экспрессии SEQ ID NO: 1 и 2 применяют разные промоторы. В некоторых воплощениях при экспрессии SEQ ID NO: 1 и 2 применяют промотор H1 и промотор U6, соответственно.

В некоторых воплощениях, промотор, применяемый при экспрессии SEQ ID NO: 5 и 6, представляет собой сильный промотор, такой как промотор H1 и промотор U6. В некоторых воплощениях при экспрессии SEQ ID NO: 5 и 6 применяют один и тот же промотор. В некоторых воплощениях при экспрессии SEQ ID NO: 5 и 6 применяют разные промоторы. В некоторых воплощениях при экспрессии SEQ ID NO: 5 и 6 применяют промотор H1 и промотор U6 соответственно.

В некоторых воплощениях, последовательности нуклеиновых кислот промотора H1 и промотора U6 соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 9 и 10, соответственно, или имеют, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательностям SEQ ID NO: 9 и 10, соответственно.

4. Рекомбинантной клетке по любому из пунктов 1-3, в которой внеклеточная область включает структуру, выбранную из группы, состоящей из домена D1 молекулы CD4 человека, домена D1 и D2 молекулы CD4 человека, домена D1-D3 молекулы CD4 человека, домена D1-D4 молекулы CD4 человека, антитела, специфически связывающегося с gp120, или его антигенсвязывающего фрагмента (такого как последовательность, показанная в SEQ ID NO: 15).

В некоторых воплощениях, внеклеточная область включает домены D1 и D2 человеческой молекулы CD4 без доменов D3 и D4. В некоторых конкретных воплощениях внеклеточная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

5. Рекомбинантной клетке по любому из пунктов 1-4, в которой трансмембранную область получают из трансмембранного домена или она включает трансмембранный домен одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы, состоящей из: цепи α , β или ζ рецептора Т-клеток, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D4, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, и NKG2C.

6. Рекомбинантной клетке по п. 5, в которой трансмембранную область получают из

трансмембранного домена или она включает трансмембранный домен молекулы белка CD8 α .

7. Рекомбинантной клетке по любому из пунктов 1-6, трансмембранная область которой включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 18.

8. Рекомбинантной клетке по любому из пунктов 1-7, в которой внутриклеточная область включает первичный домен сигнальной трансдукции, полученный из домена сигнальной трансдукции или включающий домен сигнальной трансдукции, выбранный из группы, состоящей из CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , FCER1G, Fc ϵ R1b, CD79a, CD79b, Fc γ RIIa, DAP10 и DAP12.

9. Рекомбинантной клетке по п. 8, в которой внутриклеточная область дополнительно включает костимулирующий домен, полученный из домена сигнальной трансдукции или включающий домен сигнальной трансдукции одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы, состоящей из: CD27, CD28, 4-1 BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов, специфически связывающихся с CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80, CD160, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1, SLAMF4, CD84, CD96, CEACAM1, CRTAM, Ly9, CD160, PSGL1, CD100, CD69, SLAMF6, SLAM, BLAME, SELPLG, LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D и DAP10.

10. Рекомбинантной клетке по п. 8 или 9, в которой первичный домен сигнальной трансдукции получают из домена сигнальной трансдукции CD3 ζ или включает его.

11. Рекомбинантной клетке по п. 9 или 10, в которой костимулирующий домен получают из одного из доменов или он включает домен сигнальной трансдукции CD137, CD28, 2B4 или DAP10 или их комбинации.

2. Рекомбинантной клетке по пункту 9 или 11, в которой линкерный пептид также включен во внутриклеточную область между первичным доменом сигнальной трансдукции и каждым костимулирующим доменом, в котором линкерный пептид представляет собой любой природный или синтетический пептид, который может соединять первичный домен сигнальной трансдукции и каждый костимулирующий домен и поддерживать определенное относительное пространственное расстояние для обеспечения их функциональной целостности и проведения сигнала между ними. В

некоторых конкретных воплощениях линкерный пептид представляет собой короткий пептид, образованный G и S, такой как (GS) n или (G) n (S) m , где n или m представляют собой любое положительное целое число от 1 до 20, например (GGGS) 1, 2, 3.

13. Рекомбинантной клетке по любому из пунктов 1-12, в которой внутриклеточная область включает любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 28-34 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности любой из SEQ ID NO: 28-34.

14. Рекомбинантной клетке по любому из пунктов 1-13, в которой внеклеточная область соединена с трансмембранной областью шарнирной областью.

5. Рекомбинантной клетке по п. 14, в которой шарнирную область получают из шарнирной области или она включает шарнирную область человеческого Ig, линкера GS, шарнира KIR2DS2 или шарнирную область CD8 α . В некоторых воплощениях шарнирную область получают из шарнирной области или она включает шарнирную область человеческого CD8 α . В некоторых воплощениях шарнирная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 20.

16. Рекомбинантной клетке по любому из пунктов 1-15, в которой CAR включает аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 35-46, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности любой из SEQ ID NO: 35-46.

17. Рекомбинантной клетке по любому из пунктов 1-16, в которой CAR дополнительно связан с сигнальным пептидом, который может локализовать CAR на клеточной мембране рекомбинантной клетки. В некоторых воплощениях сигнальный пептид получают из сигнального пептида или он включает сигнальный пептид из любых секреторных белков или мембранных белков.

18. Рекомбинантной клетке по пункту 17, в которой сигнальный пептид получают из сигнального пептида или он включает сигнальный пептид из CD4 или CD8.

19. Рекомбинантной клетке по любому из пунктов 1-18, сигнальный пептид которой включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 17 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 16 или 17.

В некоторых конкретных воплощениях, рекомбинантная клетка включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 и 2 (или SEQ ID NO: 5 и 6) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 или последовательность, имеющую,

рекомбинантная клетка включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 и 2 (или SEQ ID NO: 5 и 6) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46. В некоторых конкретных воплощениях рекомбинантная клетка включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3 и 4 (или SEQ ID NO: 7 и 8) и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

В других воплощениях, рекомбинантная клетка дополнительно включает репортерную молекулу и/или защитный выключатель. В некоторых конкретных воплощениях защитный выключатель выбирают из одного или нескольких из следующих: iCaspase-9, iCaspase-1, iCaspase-8, тимидинкиназа (например, HSV-TK, VZV-TK), цитозиндезаминаза (CD), CD20, tEGFR, FR806 и RQP8. В другом предпочтительном воплощении защитный выключатель представляет собой tEGFR, предпочтительно, аминокислотная последовательность tEGFR показана в SEQ ID NO: 49 или 50.

20. Вектору, включающему полинуклеотид, кодирующий CAR и/или кшРНК рекомбинантной клетки по любому из пунктов 1-19.

21. Вектору по пункту 20, выбранному из плазмид, вирусных векторов или линейных молекул нуклеиновых кислот. В некоторых конкретных воплощениях вектор представляет собой ретровирусный челночный плазмидный вектор. В некоторых воплощениях вектор представляет собой вирусный вектор SIV.

22. Вектору по п. 20 или 21, в котором экспрессия химерного антигенного рецептора и кшРНК управляется одним промотором или разными промоторами.

23. Фармацевтической композиции, включающей рекомбинантную клетку по любому из пунктов 1-19 или вектор по любому из пунктов 20-22. Фармацевтическая композиция может быть применена для лечения пациентов, инфицированных ВИЧ. В некоторых воплощениях ВИЧ-инфицированные пациенты получают длительную антиретровирусную терапию.

24. Способу лечения и/или профилактики ВИЧ-инфекции или СПИД, включающему введение субъекту, инфицированному ВИЧ или страдающему СПИД, рекомбинантной клетки по любому из пунктов 1-19 или вектора по любому из пунктов 20-22.

25. Применению рекомбинантной клетки по любому из пунктов 1-19 или вектора по любому из пунктов 20-22 при изготовлении лекарственного средства для лечения и/или профилактики ВИЧ-инфекции или СПИД.

Кроме того, в настоящей заявке также предложен способ получения рекомбинантной клетки по любому из пунктов 1-19, включающий введение вектора по

любому из пунктов 20-22 в клетку для экспрессии. В некоторых воплощениях способ включает упаковку вектора шаттл-плазмиды вируса SIV в частицы вируса SIV и инфицирование клеток с применением частиц вируса.

В другом аспекте настоящая заявка также относится к химерному антигенному рецептору (CAR), в особенности:

1. Химерному антигенному рецептору (CAR), включающий внеклеточную область, трансмембранную область и внутриклеточную область, где внеклеточную область получают из внеклеточной области человеческой молекулы CD4 или включает ее, а трансмембранную область получают из трансмембранного домена CD8 α или она включает его.

2. Химерному антигенному рецептору по пункту 1, в котором химерный антигенный рецептор дополнительно включает шарнирную область. Предпочтительно, внеклеточная область соединена с трансмембранной областью шарнирной областью.

3. Химерному антигенному рецептору по п. 2, в котором шарнирную область получают из шарнирной области человеческого Ig, линкера GS, шарнира KIR2DS2 или шарнирной области CD8 α , предпочтительно, из шарнирной области CD8 α .

4. Химерному антигенному рецептору по п. 3, в котором шарнирная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 20.

5. Химерному антигенному рецептору по любому из пунктов 1-4, в котором внеклеточная область молекулы CD4 человека состоит из доменов D1 и D2 молекулы CD4.

6. Химерному антигенному рецептору по п. 5, в котором внеклеточная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

7. Химерному антигенному рецептору по любому из пунктов 1-6, в котором трансмембранная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

8. Химерному антигенному рецептору по любому из пунктов 1-7, в котором внутриклеточная область включает первичный домен сигнальной трансдукции и костимулирующий домен, а первичный домен сигнальной трансдукции получают из домена сигнальной или он включает домен сигнальной трансдукции одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы, состоящей из: CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , FCER1G, Fc ϵ R1b, CD79a, CD79b, Fc γ RIIa, DAP10 и DAP12, а костимулирующий домен получают из домена сигнальной трансдукции или он включает домен сигнальной трансдукции одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы, состоящей из: CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C,

B7-H3, лигандов, специфически связывающихся с CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80, CD160, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1, SLAMF4, CD84, CD96, CEACAM1, CRTAM, Ly9, CD160, PSGL1, CD100, CD69, SLAMF6, SLAM, BLAME, SELPLG, LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D и DAP10.

9. Химерному антигенному рецептору по п. 8, в котором первичный домен сигнальной трансдукции получают из домена сигнальной трансдукции CD3 ζ или DAP10 или он включает их, а костимулирующий домен получают из одного из доменов сигнальной трансдукции или он включает один из доменов сигнальной трансдукции CD137, CD28, 2B4 или DAP10 или их комбинации.

10. Химерному антигенному рецептору по любому из пунктов 1-9, в котором внутриклеточная область включает:

- (i) домены сигнальной трансдукции из CD137 и CD3 ζ ;
- (ii) домены сигнальной трансдукции из CD28, CD137 и CD3 ζ ;
- (iii) домены сигнальной трансдукции из CD137, CD3 ζ и DAP10;
- (iv) домены сигнальной трансдукции из CD28, DAP10 и CD3 ζ ;
- (v) домены сигнальной трансдукции из 2B4, DAP10 и CD3 ζ ; или
- (vi) домены сигнальной трансдукции из CD137, 2B4 и CD3 ζ .

11. Химерному антигенному рецептору по любому из пунктов 8 или 9, в котором линкерный пептид также включен во внутриклеточную область между первичным доменом сигнальной трансдукции и костимулирующим доменом.

12. Химерному антигенному рецептору по п. 11, в котором последовательность линкерного пептида включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

13. Химерному антигенному рецептору по любому из пунктов 1-10, в котором последовательность внутриклеточных областей включает аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 28-34 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности любой из SEQ ID NO: 28-34.

14. Химерному антигенному рецептору по любому из пунктов 1-13, в котором дополнительный сигнальный пептид связан с химерным антигенным рецептором, и сигнальный пептид получают из сигнального пептида или включает сигнальный пептид любых секреторных белков или мембранных белков.

15. Химерному антигенному рецептору по п. 14, в котором сигнальный пептид

получают из сигнального пептида или включает сигнальный пептид молекулы CD4 или CD8, и, предпочтительно, сигнальный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 17.

16. Химерному антигенному рецептору по любому из пунктов 1-15, где химерный антигенный рецептор включает аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 35, 36, 43-46 или включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности любой из SEQ ID NO: 35, 36, 43-46.

17. Полинуклеотиду, кодирующему химерный антигенный рецептор по любому из пунктов 1-16.

18. Вектору, включающему полинуклеотид по пункту 17.

19. Вектору по пункту 18, выбранному из группы, состоящей из плазмид, вирусных векторов или линейных молекул нуклеиновых кислот.

20. Рекомбинантной клетке, включающей химерный антигенный рецептор по любому из пунктов 1-16, или полинуклеотид по пункту 17, или вектор по пункту 18 или 19.

21. Рекомбинантной клетке по пункту 20, в котором рекомбинантную клетку получают от человека или примата. Более предпочтительно, рекомбинантную клетку получают от пациентов, инфицированных ВИЧ, или от здоровой популяции. Более предпочтительно, рекомбинантную клетку получают из ВИЧ рецепторной клетки, мононуклеарной клетки периферической крови или лимфоцита; еще более предпочтительно, рекомбинантную клетку получают из Т-клеток (например, наивной Т-клетки, Т-клетки памяти, эффекторной Т-клетки, цитотоксической Т-клетки, хелперной Т-клетки, регуляторной Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, НКТ-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки и т. д.), НК-клетки, антигенпрезентирующей клетки (например, макрофага, дендритной клетки и т.д.); или рекомбинантную клетку получают из клетки-предшественника или стволовой клетки, включая без ограничения гемопоэтическую стволовую клетку, гемопоэтическую клетку-предшественника, стволовую Т-клетку памяти (например, центральную Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или подобную стволовой клетке Т-клетку памяти).

Кроме того, настоящая заявка также относится к комбинации вышеуказанного химерного антигенного рецептора и, по меньшей мере, одной кшРНК/нуклеиновой кислоты, кодирующей кшРНК/вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, в особенности:

22. Комбинации химерного антигенного рецептора по пунктам 1-16 или

полинуклеотида по пункту 17, вектора по пункту 18 или 19 или рекомбинантной клетки по пункту 20 или 21 и, по меньшей мере, одной кшРНК, нацеленной на ВИЧ, или кодирующей ее нуклеиновой кислоты, или вектора, включающего ее нуклеиновую кислоту.

23. Комбинации по пункту 22, в которой, по меньшей мере, одна кшРНК нацелена на любой один или несколько генов хозяина или генов ВИЧ, участвующих в жизненном цикле ВИЧ, выбранных из группы, состоящей из NF-κB, CCR5, TSG101, CXCR4, P-TEFb, tat, rev, nef, env, LTR и gag.

Комбинации по пункту 23, в которой комбинация включает:

(i) кшРНК, нацеленную на gag, и кшРНК, нацеленную на LTR, или

(ii) кшРНК, нацеленную на gag, и кшРНК, нацеленную на nef.

25. Комбинации по пунктам 23 или 24, в которой кшРНК, нацеленная на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 1 или 5 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 5, кшРНК, нацеленная на LTR, включает последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 2, и кшРНК, нацеленная на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 6 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 6.

26. Комбинации по пункту 25, в которой комбинация включает:

(i) кшРНК, нацеленную на gag, и кшРНК, нацеленную на LTR, в которой кшРНК, нацеленная на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 1, а кшРНК, нацеленная на LTR, включает последовательность SEQ ID NO: 2.

(ii) кшРНК, нацеленную на gag, и кшРНК, нацеленную на nef, в которой кшРНК, нацеленная на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 5, а кшРНК, нацеленная на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 6.

27. Комбинации по пункту 23, в которой комбинация включает:

(i) нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на gag, и нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на LTR, или вектор, включающий указанную выше нуклеиновую кислоту, или

(ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на gag, и нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на nef, или вектор, включающий указанную выше нуклеиновую кислоту.

28. Комбинации пунктов 23 или 27, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 3 или 7 или

последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 3 или 7, и нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на LTR, включает последовательность SEQ ID NO: 4 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 4, и нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 8 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 8.

29. Комбинации по пункту 28, в которой комбинация включает:

(i) нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на gag и нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на LTR, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 3, и нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на LTR, включает последовательность SEQ ID NO: 4, или вектор, включающий указанную выше нуклеиновую кислоту, или

(ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на gag и нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на nef, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 7, и нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 8, или вектор, включающий указанную выше нуклеиновую кислоту.

Фармацевтическая композиция, включающая комбинацию рекомбинантной клетки по пункту 20 или 21 или рекомбинантной клетки по любому из пунктов 22-29 и, по меньшей мере, одной кшРНК или нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или вектора, включающего ее нуклеиновую кислоту, и фармацевтически приемлемого носителя. В конкретном воплощении фармацевтическая композиция дополнительно включает другие анти-ВИЧ препараты, включая без ограничений, ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы протеазы, вакцины против ВИЧ, нейтрализующие антитела широкого спектра действия и/или клетки CAR-T. В другом конкретном воплощении фармацевтическая композиция по настоящему изобретению применяют для лечения и/или профилактики ВИЧ-инфекции или СПИД.

31. Применению комбинации химерного антигенного рецептора по пунктам 1-16, или полинуклеотидной последовательности по пункту 17, или вектора, описанного в пункте 18 или 19, или клетки, описанной в пункте 20 или 21, или по любому из пунктов 22-29 при изготовлении лекарственного средства для лечения и/или профилактики ВИЧ-

инфекции или СПИД.

32. Способ лечения и/или профилактики ВИЧ-инфекции или СПИД, включающий введение субъекту, инфицированному ВИЧ или страдающему СПИД, комбинации клетки по п. 20 или 21 или рекомбинантной клетки по любому из пунктов 22-29 и, по меньшей мере, одной кшРНК или нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или вектора, включающего ее нуклеиновую кислоту, или фармацевтической композиции по п. 30. В конкретном воплощении настоящего изобретения при введении комбинации рекомбинантной клетки по любому из пунктов 22-29 и, по меньшей мере, одной кшРНК или нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или вектора, включающего ее нуклеиновую кислоту, рекомбинантную клетку и, по меньшей мере, одну кшРНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую ее, или вектор, включающий ее нуклеиновую кислоту, можно вводить последовательно или одновременно. В конкретном воплощении настоящего изобретения способ дополнительно включает введение субъекту других препаратов против ВИЧ, включая, без ограничений, другие нуклеозидные ингибиторы, вакцины против ВИЧ, нейтрализующие антитела широкого спектра действия и/или CAR-T-клетки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1А-1С показаны области функциональной структуры, вставленные между сайтами ферментативного расщепления Xba I и BamH I в каждой плазмиде, протестированной в примерах в настоящем документе, включая функциональные структуры кодирующих последовательностей CAR и/или кодирующих последовательностей кшРНК, и/или репортерных генов. G3L2 представляет собой кодирующую последовательность кшРНК (последовательность которой SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно) для Gag и LTR, а G2N представляет собой кодирующую последовательность кшРНК (последовательность которой SEQ ID NO: 5 и 6 соответственно) для Gag и Nef.

На фиг. 2А-2С показана структура трех репрезентативных плазмид, на фиг. 2А показана структура исходной плазмиды pGTV-PEDF, на фиг. 2В показана структура плазмиды Z09, а на фиг. 2С показана структура плазмиды Z01.

На фиг. 3 показан результат проточной цитометрии на основе молекул CAR или внутриклеточных репортерных генов после того, как рекомбинантный лентивирус SIV, несущий различные молекулы CAR, был трансдуцирован в клетки 293Т. CD4⁺ относится к положительным клеткам CD4, полученным путем проведения проточной цитометрии и анализа с применением антитела против человеческого CD4 на трансдуцированных 293Т. RFP⁺ относится к клеткам, положительным на мономерный красный флуоресцентный белок mRFP, который коэкспрессируется с молекулами CAR, обнаруженными с помощью

прямой проточной цитометрии. CTRL представляют собой клетки 293Т, не трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом SIV.

На фиг. 4 показаны результаты иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии на основе молекул CAR или внеклеточного репортерного гена tEGFR, коэкспрессируемых с молекулами CAR после трансдукции рекомбинантного лентивируса SIV-Z09 в клетки 293Т, на фиг. 4А показан результат двойного окрашивания двумя антителами, на фиг. 4В показан результат одинарного окрашивания антителами против CD4, на фиг. 4С показан результат одинарного окрашивания антителами против EGFR, а на фиг. 4D показан контроль без окрашивания. CD4⁺ относится к положительным по CD4 клеткам, которые получены путем иммунофлуоресцентного окрашивания и анализа проточной цитометрии с применением антител против человеческого CD4 на трансдуцированных 293Т, а EGFR⁺ относится к положительным по EGFR клеткам, полученным путем иммунофлуоресцентного окрашивания и анализа проточной цитометрии с применением антител против человеческого EGFR на трансдуцированных 293Т.

На фиг. 5 показан результат проточной цитометрии после активации Т-клеток CD3⁺ в течение 48-ми часов с помощью магнитных шариков CD3/CD28 и цитокинов. Соотношение активированных клеток относится к соотношению клеток CD3⁺CD25⁺ в Т-клетках CD3⁺. Контрольная группа относится к Т-клеткам CD3⁺, которые не активируются магнитными шариками и цитокинами, а экспериментальная (Эксп.) группа относится к Т-клеткам CD3⁺, активированным магнитными шариками и цитокинами.

На фиг. 6 показаны результаты определения количества клеток и жизнеспособности клеток CD3⁺ Т-клеток в течение 12-ти дней после активации. Через 48 часов после активации CD3⁺ Т-клетки были трансдуцированы рекомбинантным лентивирусом SIV. Сплошные линии на графике представляют количество клеток и соответствуют левой оси Y. Пунктирные линии представляют жизнеспособность клеток и соответствуют правой оси Y. EGFP относится к CD3⁺ Т-клеткам, трансдуцированным рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP, а CD3 представляет собой CD3⁺ Т-клетки, которые не трансдуцированы каким-либо рекомбинантным лентивирусом SIV. Названия молекул CAR, переносимых рекомбинантным лентивирусом SIV, соответственно отмечены над фигурами 6А-6Q.

На фиг. 7 показаны результаты обнаружения и анализа с помощью проточной цитометрии на основе поверхностного маркера и внутриклеточного репортерного гена модифицированных CD3⁺ Т-клеток. На фиг. 7А показано соотношение положительных клеток на 13-й день после активации, а на фиг. 7В показано соотношение положительных

клеток на 19-й день после активации. Соотношение модифицированных положительных было клеток получено с помощью проточной цитометрии обнаружения и анализа на основе репортерного гена; CTRL относится к CD3⁺ Т-клеткам, трансдуцированным рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP, а CD3 относится к CD3⁺ Т-клеткам, которые не были трансдуцированы каким-либо рекомбинантным лентивирусом SIV.

На фиг. 8 показаны результаты проточной цитометрии и анализа на основе поверхностных маркеров нетрансдуцированных CD3⁺ Т-клеток. На фиг. 8А показано соотношение CD3⁺ Т-клеток в различные моменты времени, а на фиг. 8В показано соотношение CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток в различные моменты времени.

На фиг. 9 показаны результаты обнаружения и анализа с помощью проточной цитометрии на основе поверхностных маркеров трансдуцированных CD3⁺ Т-клеток. На фиг. 9А показано соотношение CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток, соответственно, после того, как CD3⁺ Т-клетки были трансдуцированы рекомбинантным лентивирусом SIV-Z09 (экспрессирующим внеклеточную область CD4), а на фиг. 9В показано соотношение CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток, соответственно, после того, как CD3⁺ Т-клетки были трансдуцированы рекомбинантным лентивирусом SIV-Z14 (не экспрессирующим внеклеточную область CD4).

На фиг. 10 показаны результаты обнаружения и анализа с помощью проточной цитометрии модифицированных CD3⁺ Т-клеток после смешивания с клетками-мишенями в фиксированном соотношении 3: 1. Все клетки-мишени представляют собой клетки 293F, полученные путем трансфекции плазмидами pAcGFP, экспрессирующими мембранный белок gp120 различных штаммов вируса ВИЧ соответственно, и скрининга с помощью G418, а исходный зеленый флуоресцентный белок AcGFP в плазмиде был коэкспрессирован с gp120 с помощью P2A. На фиг. 10А клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ AC10.29. На фиг. 10В клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ NL4-3. На фиг. 10С клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ SF162. На фиг. 10D клетки-мишени экспрессируют только AcGFP. На оси X отмечены соответствующие молекулярные структуры CAR в модифицированных CD3⁺ Т-клетках. CTRL относится к CD3⁺ Т-клеткам, трансдуцированным рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP, а CD3 относится к CD3⁺ Т-клеткам, которые не были трансдуцированы каким-либо рекомбинантным лентивирусом SIV. Количество клеток-мишеней, смешанных в течение 24-х часов, было рассчитано и обнаружено на основе результата проточной цитометрии обнаружения клеток GFP⁺ CD3-293F. Затем относительное уменьшение количества клеток-мишеней в каждой экспериментальной группе по сравнению с группой, в которой CD3⁺ Т-клетки были трансдуцированы

рекомбинантным лентивирусом SIV-Z17, было соответственно рассчитано как степень ингибирования каждого образца для клеток-мишеней.

На фиг. 11 показаны результаты обнаружения и анализа цитокина IFN- γ в супернатанте через 24 часа после смешивания модифицированных CD3⁺ Т-клеток с клетками-мишенями в фиксированном соотношении 3:1. На фиг. 11А клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ AC10.29. На фиг. 11В клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ NL4-3. На фиг. 11С клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ SF162. На фиг. 11D клетки-мишени экспрессируют только AcGFP. На оси X отмечены соответствующие молекулярные структуры CAR в модифицированных CD3⁺ Т-клетках. CTRL относится к CD3⁺ Т-клеткам, трансдуцированным рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP, а CD3 относится к CD3⁺ Т-клеткам, которые не были трансдуцированы каким-либо рекомбинантным лентивирусом SIV.

На фиг. 12 показаны результаты ранней активности уничтожения против клеток-мишеней после смешивания модифицированных CD3⁺ Т-клеток с клетками-мишенями в различных соотношениях. Содержание лактатдегидрогеназы LDH в супернатанте через 4 часа после смешивания было обнаружено и рассчитано с применением набора для определения нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox 96. На фиг. 12А клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ AC10.29. На фиг. 12В клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ NL4-3, на фиг. 12С клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ SF162. На фиг. 12D клетки-мишени экспрессируют человеческий лейкоцитарный антиген DR0401. Символы Z09, Z10 и CTRL обозначают структуры, применяемые в соответствующих модифицированных клетках, где Z09 и Z10 обозначают CD3⁺ Т-клетки, трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом SIV-Z09 и SIV-Z10 соответственно, а CTRL представляют собой CD3⁺ Т-клетки, трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP.

На фиг. 13 показаны результаты ингибирующего эффекта на клетки-мишени через 24 часа после смешивания модифицированных CD3⁺ Т-клеток с клетками-мишенями в различных соотношениях. Через 24 часа после смешивания результаты проточной цитометрии и анализа на клетках GFP+CD3-293F применяли для расчета количества клеток-мишеней, смешанных в течение 24-х часов, а затем относительное уменьшение количества клеток-мишеней в каждой экспериментальной группе по сравнению с контролем CTRL с соотношением эффектор : мишень 1 : 1 соответственно рассчитывали как скорость ингибирования каждого образца на клетки-мишени. На фиг. 13А клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ AC10.29. На фиг. 13В клетки-мишени

экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ NL4-3. На фиг. 13C клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ SF162. На фиг. 13D клетки-мишени экспрессируют человеческий лейкоцитарный антиген DR0401. CTRL представляют собой CD3+ Т-клетки, трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP.

На фиг. 14 показаны результаты обнаружения мультиплексных цитокинов в супернатанте культуры после смешивания модифицированных CD3+ Т-клеток с клетками-мишенями в различных соотношениях. Через 24 часа после смешивания уровни 12 цитокинов в супернатанте были одновременно обнаружены с помощью Lumiplex (фиг. 14A-14L). На рисунке показан gp120 вируса ВИЧ соответствующей клетки-мишени, а на оси X показаны соответствующая структура и соотношение эффектор : мишень для модифицированной клетки. CTRL представляют собой CD3+ Т-клетки, трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP. Пунктирная линия, параллельная оси X представляют собой порог обнаружения.

На фиг. 15 показаны результаты проточной цитометрии Т-клеток CD3+ на 19-й день после активации. Соотношение активированных клеток относится к соотношению клеток CD3+CD25+ в Т-клетках CD3+. Контрольная группа относится к неокрашенным Т-клеткам CD3+, а экспериментальная группа относится к Т-клеткам CD3+, выявленным после окрашивания.

На фиг. 16 показаны результаты обнаружения и анализа с помощью проточной цитометрии модифицированных CD3+ Т-клеток после смешивания с клетками-мишенями в фиксированном соотношении 3:1 и продлённой культуры. На фиг. 16A клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ AC10.29. На фиг. 16B клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ NL4-3. На фиг. 16C клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ SF162. На фиг. 16D клетки-мишени экспрессируют только AcGFP. На оси X отмечены молекулярные структуры CAR в соответствующих модифицированных CD3+ Т-клетках. CTRL относится к CD3+ Т-клеткам, трансдуцированным рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP, а CD3 относится к CD3+ Т-клеткам, которые не были трансдуцированы каким-либо рекомбинантным лентивирусом SIV. Количество клеток-мишеней, смешанных в течение 24-х часов, было рассчитано и обнаружено на основе результата проточной цитометрии обнаружения клеток GFP+CD3- 293F. Затем относительное уменьшение количества клеток-мишеней в каждом образце экспериментальной группы по сравнению с группой, где клетки CD3+ Т были трансдуцированы рекомбинантным лентивирусом SIV-Z17, было соответственно рассчитано как скорость ингибирования каждого образца для клеток-мишеней.

На фиг. 17 показаны результаты обнаружения и анализа культурального

супернатанта модифицированных CD3⁺ Т-клеток после смешивания с клетками-мишенями в фиксированном соотношении 3:1 и продленной культурой. Цитокин IFN- γ в супернатанте был обнаружен и проанализирован с помощью ELISA через 24 часа после смешивания. На фиг. 17А клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ AC10.29. На фиг. 17В клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ NL4-3. На фиг. 17С клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ SF162. На фиг. 17D клетки-мишени экспрессируют только AcGFP. На оси X отмечены соответствующие молекулярные структуры CAR в модифицированных CD3⁺ Т-клетках, CTRL представляют собой CD3⁺ Т-клетки, трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP, а CD3 относится к CD3⁺ Т-клеткам, которые не были трансдуцированы каким-либо рекомбинантным лентивирусом SIV.

На фиг. 18 показаны результаты обнаружения и анализа с помощью проточной цитометрии модифицированных CD3⁺ Т-клеток через 24 часа после продленной культуры, а затем смешанных с клетками-мишенями в различных соотношениях. Результаты обнаружения и анализа с помощью проточной цитометрии клеток GFP+CD3⁻ 293F применяли для расчета количества целевых клеток, смешанных в течение 24 часов, а затем относительное уменьшение количества целевых клеток в каждой экспериментальной группе по сравнению с таковым в образце CD3⁺ Т-клеток, трансдуцированном рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP с соотношением эффектор : мишень 1 : 1, было соответственно рассчитано как скорость ингибирования каждого образца целевых клеток. На фиг. 18А клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ AC10.29. На фиг. 18В клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ NL4-3. На фиг. 18С клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ SF162. На фиг. 18D, клетки-мишени экспрессируют человеческий лейкоцитарный антиген DR0401 (MHCII). CTRL относится к CD3⁺ Т-клеткам, трансдуцированным рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP, а CD3 относится к CD3⁺ Т-клеткам, не трансдуцированным рекомбинантным лентивирусом SIV.

На фиг. 19 показаны результаты обнаружения мультиплексного цитокина в супернатанте культуры после смешивания модифицированных CD3⁺ Т-клеток с клетками-мишенями в фиксированном соотношении 3:1. Через 24 часа после смешивания уровни 12 цитокинов в супернатанте были одновременно обнаружены с помощью Luminex (фиг. 21А-21L). На рисунке показан gp120 вируса ВИЧ соответствующей клетки-мишени, а соответствующая структура и соотношение эффектор: мишень модифицированной клетки показаны на оси X. CTRL представляют собой CD3⁺ Т-клетки, трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP. Пунктирная линия, параллельная оси X,

представляет собой порог обнаружения.

На фиг. 20 показаны результаты обнаружения и анализа с помощью проточной цитометрии модифицированных CD3⁺ Т-клеток после смешивания с клетками-мишенями в фиксированном соотношении 3:1 и продленной культурой. Модифицированные CD3⁺ Т-клетки отличались от целевых клеток на основе экспрессии CD3⁺ и CAR, на которую указывал ген-репортер флуоресцентного белка. На фиг. 20А клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ AC10.29. На фиг. 20В клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ NL4-3. На фиг. 20С клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ SF162. На фиг. 20D клетки-мишени экспрессируют только AcGFP. На оси X отмечены соответствующие молекулярные структуры CAR в модифицированных CD3⁺ Т-клетках, CTRL представляют собой CD3⁺ Т-клетки, трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP, а CD3 относится к CD3⁺ Т-клеткам, которые не были трансдуцированы каким-либо рекомбинантным лентивирусом SIV.

На фиг. 21 показаны результаты обнаружения и анализа с помощью проточной цитометрии на клетках-мишенях после того, как модифицированные CD3⁺ Т-клетки были смешаны с клетками-мишенями в фиксированном соотношении 3:1 и продленной культурой. Клетки-мишени отличали от модифицированных CD3⁺ Т-клеток на основе CD3⁻. На фиг. 21А клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ AC10.29. На фиг. 21В клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ NL4-3. На фиг. 21С клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ SF162. На фиг. 21D клетки-мишени экспрессируют только AcGFP. На оси X отмечены соответствующие молекулярные структуры CAR в модифицированных CD3⁺ Т-клетках, CTRL представляют собой CD3⁺ Т-клетки, трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP, а CD3 относится к CD3⁺ Т-клеткам, которые не были трансдуцированы каким-либо рекомбинантным лентивирусом SIV. Количество клеток-мишеней, смешанных в течение 24-х часов, было рассчитано и обнаружено на основе результата проточной цитометрии клеток GFP+CD3⁻ 293F. Затем относительное уменьшение количества клеток-мишеней в каждой экспериментальной группе по сравнению с контрольной группой CD3 было соответственно рассчитано как скорость ингибирования каждого образца для клеток-мишеней.

На фиг. 22 показаны результаты обнаружения и анализа с помощью проточной цитометрии модифицированных CD3⁺ Т-клеток после смешивания с клетками-мишенями в различных соотношениях и продленной культурой. Различные структуры и соотношения эффектор:мишень обозначены на оси X, где CTRL представляют собой CD3⁺ Т-клетки,

трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP. Модифицированные CD3+ Т-клетки отличались от целевых клеток на основе экспрессии CD3+ и CAR, которая была обозначена репортерным геном флуоресцентного белка. На фиг. 22А клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ AC10.29. На фиг. 22В клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ NL4-3. На фиг. 22С клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ SF162. На фиг. 22D клетки-мишени экспрессируют человеческий лейкоцитарный антиген DR0401.

На фиг. 23 показаны результаты обнаружения и анализа с помощью проточной цитометрии на клетках-мишенях после смешивания с модифицированными CD3+ Т-клетками в различных соотношениях и продленной культурой. Различные структуры и соотношения эффектор:мишень обозначены на оси X. Клетки-мишени были отделены от модифицированных CD3+ Т-клеток на основе CD3-. На фиг. 23А клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ AC10.29. На фиг. 23В клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ NL4-3. На фиг. 23С клетки-мишени экспрессируют gp120 штамма вируса ВИЧ SF162. На фиг. 23D клетки-мишени экспрессируют человеческий лейкоцитарный антиген DR0401. Символы Z09, Z10 и CTRL указывают молекулярные структуры CAR, соответствующие модифицированным клеткам, где CTRL относится к CD3+ Т-клеткам, трансдуцированным рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP. Количество клеток-мишеней, смешанных в течение 24-х часов, рассчитывали на основе результатов обнаружения с помощью проточной цитометрии клеток GFP+CD3-293F. Затем относительное уменьшение количества клеток-мишеней в каждой экспериментальной группе по сравнению с таковым в образце CTRL с соотношением эффектор:мишень 1:1 соответственно рассчитывали как скорость ингибирования каждого образца по отношению к клеткам-мишеням.

На фиг. 24 показаны результаты обнаружения с помощью ELISA вирусных продуктов ВИЧ, собранных в различные временные точки в культуральном супернатанте модифицированных клеток пациента с ВИЧ, и результаты обнаружения и анализа с помощью проточной цитометрии клеток в конечный момент времени. На фиг. 24А показана концентрация вируса p24 в культуральном супернатанте. CTRL представляет собой контроль модифицированных клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей G3L2 кшРНК, CD3 представляет собой контролем модифицированных клеток, которые не трансдуцированы каким-либо рекомбинантным лентивирусом SIV. Фиг. 24Б представляет собой результат обнаружения и анализа клеток способом проточной цитометрии через 24 дня после активации.

ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В предшествующем уровне техники существует множество ограничений на клеточную терапию (например, CAR-T-клетки) для ВИЧ-инфицированных клеток. С одной стороны, ее специфическая активность в отношении уничтожения клеток недостаточна; с другой стороны, она склонна к заражению ВИЧ и может быть исчерпана, поэтому продолжительность эффективности сокращается. Для решения вышеуказанных проблем в одном аспекте настоящая заявка обеспечивает рекомбинантную клетку (например, CAR-T-клетки), которая имеет более сильную активность в отношении уничтожения клеток для ВИЧ-инфицированных клеток, поддерживается в течение более длительного периода времени в ВИЧ-инфицированной среде и имеет более длительную продолжительность эффективности, и нуклеиновые кислоты и векторы, кодирующие CAR и другие функциональные структуры рекомбинантных клеток, фармацевтические композиции и терапии для лечения ВИЧ-инфекции. Другой аспект настоящей заявки обеспечивает химерную молекулу антигенного рецептора (CAR), и клетки, включающие молекулу CAR, которые имеют эффективную и специфическую активность в отношении уничтожения клеток против ВИЧ-инфицированных клеток.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В целях пояснения описания будут применены следующие определения, и, при необходимости, терминология, применяемая в единственном числе, будет также включать формы множественного числа и наоборот. Если какое-либо из определений, изложенных ниже, противоречит какому-либо из документов, включенных в настоящий документ посредством ссылки, то предлагаемое в описании определение будет иметь преимущественную силу.

Как применено в настоящем документе, «кшРНК» представляет собой короткую шпилечную РНК или малую шпилечную РНК, которая представляет собой искусственную молекулу РНК со шпилечной структурой и может применяться для подавления экспрессии целевого гена посредством РНК-интерференции.

Как применено в настоящем документе, «химерный антигенный рецептор (CAR)» представляет собой класс сконструированных рецепторов клеточной поверхности, обычно экспрессируемых на иммунных эффекторных клетках (таких как эффекторные Т-клетки), которые опосредуют уничтожение клеток со специфическими мишенями (в настоящей заявке именуемых «клетками-мишенями», такими как клетки, экспрессирующие белок оболочки ВИЧ gp120 на поверхности клетки) сконструированными иммунными эффекторными клетками. CAR обычно включает внеклеточную область, внутриклеточную область и трансмембранную область между ними. «Внеклеточная область» включает

антиген-специфический домен распознавания, который может специфически распознавать и связываться с антигеном. В некоторых воплощениях область распознавания антигена и трансмембранный домен соединены шарнирной областью. «Внутриклеточная область» может включать один или несколько первичных сигнальных доменов и один или несколько костимулирующих доменов. После связывания антиген-специфического домена распознавания с антигеном с образованием бинарного комплекса и последующего конформационного изменения внутриклеточная область может инициировать ряд биохимических реакций, заставляя иммунные эффекторские клетки, где находится CAR, генерировать биологические эффекты, такие как секреция цитокинов или прямое уничтожение клеток-мишеней. В настоящем документе, если не указано иное, «первичный домен сигнальной трансдукции» обеспечивает первый сигнал активации лимфоцитов (таких как эффекторные Т-клетки), в то время как «костимулирующий домен» обеспечивает второй сигнал активации лимфоцитов. Как «первичный домен сигнальной трансдукции», так и «костимулирующий домен» происходят от «домена сигнальной трансдукции» молекулы рецептора, который относится к домену молекулы рецептора, который частично или полностью расположен внутри клетки и играет роль в передаче сигнала после того, как рецептор специфически связывается с лигандом.

Как применено в настоящем документе, «костимулирующий домен» в основном применяют для обеспечения костимулирующих сигналов для усиления активности иммунных клеток, включая, например, усиление пролиферации, выживания и/или развития клеток памяти. В некоторых воплощениях «костимулирующий домен» выбирают из доменов сигнальной трансдукции из CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134) и т.п.

Как применено в настоящем документе, термин «трансмембранная область» относится к структурной области белка, которая закреплена в клеточной мембране и термодинамически стабильна. Трансмембранные домены могут быть получены из природных белков, таких как полученные из рецептора Т-клеток (TCR). В некоторых воплощениях трансмембранный домен выбирают из трансмембранных доменов CD4, CD8 α , CD28 и CD3 ζ .

Как применено в настоящем документе, «шарнирная область» представляет собой сегмент пептидной цепи, соединяющий антиген-специфический домен распознавания или внеклеточную область и трансмембранный домен, обычно эластична. В некоторых воплощениях шарнирная область получена от шарнира IgG или шарнирной области CD8 α /CD28. «Шарнир» IgG относится к области между функциональными областями CH1 и CH2 IgG, обычно включающей большое количество пролинов.

Как применено в настоящем документе, «CAR-T», т.е. химерный антигенный

рецептор-Т-клетка, представляет собой Т-клетку, которая экспрессирует химерную молекулу антигенного рецептора на поверхности клетки и может распознавать антиген на поверхности клетки-мишени. CAR-T в настоящее время разработан до четвертого поколения. Молекула CAR первого поколения CAR-T была образована путем соединения домена сигнальной трансдукции цепи CD3 ζ или Fc ϵ RI γ с областью распознавания антигена и не имела костимулирующего домена. CAR-T первого поколения имел ограниченную способность к пролиферации *in vivo* и был склонен к апоптозу. Во втором поколении CAR в CAR был добавлен костимулирующий домен, такой как CD28 или 4-1BB (CD137). CD28 обладает сильной противоопухолевой активностью, и преимущества 4-1BB заключаются в том, что он может продлевать время выживания Т-лимфоцитов и поддерживать свой противоопухолевый эффект. Второе поколение CAR обладало более сильной способностью к пролиферации, чем первое поколение CAR, и могло секретировать больше цитокинов и антиапоптотических белков. Третье поколение CAR-T могло не только экспрессировать две костимулирующие сигнальные молекулы одновременно, но и секретировать больше IFN- γ , который имел еще более высокую противоопухолевую цитотоксичность. Четвертое поколение CAR-T также могло секретировать специфические цитокины (такие как IL-12) в опухолях, тем самым изменяя микроокружение опухоли и влияя и активируя другие иммунные клетки для генерации иммунного ответа.

Как применено в настоящем документе, термин «линкерный пептид» относится к олигопептидной или полипептидной области длиной около 1–100 аминокислот, которая связывает вместе любые домены/регионы CAR настоящего изобретения. Линкерный пептид может состоять из гибких остатков, таких как глицин и серин, так что соседние домены белка могут свободно перемещаться относительно друг друга. Более длинные линкерные пептиды могут применяться, когда желательно гарантировать, что два соседних домена стерически не будут мешать друг другу.

В настоящей заявке «GS-линкер», как вид линкерного пептида, относится к гибкому линкерному пептиду, состоящему из глицина (G) и серина (S). Наиболее распространенным GS-линкером является (GGGS) n . Расстояние между доменами может быть увеличено или уменьшено путем изменения числа n .

Как применено в настоящем документе, «CD4» представляет собой кластер дифференцированных антигенов, который представляет собой члена суперсемейства иммуноглобулинов, экспрессируемых на поверхности хелперных Т-клеток (Th), регуляторных Т-клеток, моноцитов, макрофагов и дендритных клеток, и играет важную роль в развитии и активации Т-клеток. CD4 включает аминоконцевой внеклеточный

домен (включающий четыре домена иммуноглобулина, экспонированных на внешней поверхности клетки: D1, D2, D3 и D4, представляющих Ig-подобную структуру), трансмембранный домен и короткую цитоплазматическую хвостовую область. D1 и D3 подобны вариабельным областям иммуноглобулина. D2 и D4 подобны константной области иммуноглобулина. CD4 также является основным рецептором ВИЧ, а CD4-положительная (CD4+) Т-клетка является мишенью атаки ВИЧ (вируса иммунодефицита человека).

Как применено в настоящем документе, «gp120» представляет собой гликопротеин, экспонированный на поверхности оболочки ВИЧ. 120 в его названии получена от его молекулярной массы 120 кДа. На Т-хелперных клетках gp120 может связываться с CD4, вызывая конформационные изменения в gp120 и gp41 и позволяя ВИЧ-1 связываться с корцепторами (такими как CCR5 или CXCR4), экспрессируемыми на клетках-хозяевах, и в конечном итоге оболочка ВИЧ сливается с клеточной мембраной, что приводит к проникновению вируса в клетку.

Как описано в настоящем документе, термин «антитело» включает полноразмерные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Полноразмерные антитела включают две тяжелые цепи и две легкие цепи. Вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи отвечают за связывание антигена. Вариабельные области двух цепей обычно включают три гипервариабельные петли, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR) (CDR легкой цепи (LC), включающие LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3, CDR тяжелой цепи (HC), включающие HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3). Три области CDR тяжелой цепи или легкой цепи вставлены между фланкирующими сегментами, называемыми каркасными областями (FR), которые более консервативны, чем области CDR, и образуют каркас для поддержки гипервариабельных петель. Константные области тяжелой и легкой цепей не участвуют в связывании антигена, но могут проявлять различные эффекторные функции. Антитела классифицируют на основе аминокислотных последовательностей их константных областей тяжелой цепи. Пять основных классов или изотипов антител представляют собой IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, характеризующиеся тяжелыми цепями типа α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Несколько основных классов антител делятся на подклассы, такие как IgG1 (тяжелая цепь $\gamma 1$), IgG2 (тяжелая цепь $\gamma 2$), IgG3 (тяжелая цепь $\gamma 3$), IgG4 (тяжелая цепь $\gamma 4$), IgA1 (тяжелая цепь $\alpha 1$) или IgA2 (тяжелая цепь $\alpha 2$).

Как описано в настоящем документе, термин «антигенсвязывающий фрагмент» включает фрагмент антитела, такой как диатело, Fab, Fab', F (ab')₂, фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидами фрагмент антитела Fv (dsFv), (dsFv)₂,

биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидами диатело (ds-Diabody), одноцепочечный Fv (scFv), димер scFv (двухвалентный диатело), мультиспецифическое антитело, состоящее из фрагментов антител, содержащих один или несколько CDR, однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, способный связываться с антигеном, но не включающий полной структуры антитела. Антигенсвязывающий фрагмент может связывать тот же антиген, что и родительское антитело или фрагмент родительского антитела (например, родительский scFv). Антигенсвязывающие фрагменты также включают слитые белки, включающие фрагменты антител, описанные выше.

Как применено в настоящем документе, термин «специфическое связывание» относится к контакту между антителом и антигеном, рецептором и лигандом или специфическим доменом распознавания антигена и антигеном с аффинностью связывания, по меньшей мере, 10^{-6} М. В некоторых аспектах связывающая способность составляет, по меньшей мере, около 10^{-7} М, предпочтительно, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или 10^{-12} М.

В настоящей заявке термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» и «молекула нуклеиновой кислоты» можно применять взаимозаменяемо, включая, помимо прочего, ДНК, РНК, кДНК (комплементарная ДНК), мРНК (информационная РНК), рРНК (рибосомальная РНК), кшРНК (малая шпилечная РНК), мяРНК (малая ядерная РНК), мякРНК (короткая ядрышковая РНК), miRNA (микроРНК), геномная ДНК, синтетическая ДНК, синтетическая РНК и/или тРНК.

Как применено в настоящем документе, «векторы», «клонирование векторы» и «векторы экспрессии» относятся к векторам, посредством которых полинуклеотидные последовательности (например, чужеродные гены) могут быть введены в клетку-хозяина для трансформации хозяина и облегчения экспрессии введенной последовательности (например, транскрипции и трансляции). Векторы включают плазмиды, фаги, вирусы и тому подобное.

Как применено в настоящем документе, «иммунные эффекторный клетки» относятся к клеткам, способным вызывать иммунные эффекты и иммунные ответы против целевых антигенов или целевых клеток, например, клетки с эффектами иммунного уничтожения и эффектами иммунного ответа, например, Т-клетки и тому подобное.

Как применено в настоящем документе, «сигнальный пептид» относится к короткой пептидной цепи, обычно длиной от 5 до 30 аминокислот, которая направляет перенос вновь синтезированных белков по секреторному пути. В некоторых воплощениях сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид мембранной локализации, то есть аминокислотную последовательность, применяемую для управления

трансмембранным переносом и/или локализацией белка. В большинстве случаев сигнальный пептид расположен на N-конце аминокислотной последовательности. В мРНК кодирующая последовательность сигнального пептида обычно располагается после иницирующего кодона, который представляет собой область РНК, кодирующую гидрофобную аминокислотную последовательность. После того, как сигнальный пептид направляет белок для завершения его позиционирования, его обычно вырезают под действием сигнальной пептидазы.

Как применено в настоящем документе, «защитный выключатель» относится к сконструированному белку, разработанному для предотвращения потенциальной токсичности или неблагоприятных эффектов клеточной терапии другими способами. В некоторых воплощениях экспрессия защитного выключателя условно контролируется для решения проблем безопасности трансплантированных сконструированных клеток/рекомбинантных клеток. В некоторых воплощениях ген, кодирующий защитный выключатель, может быть постоянно включен в геном клетки. В некоторых воплощениях защитный выключатель способен опосредовать индукцию апоптоза, ингибирование синтеза белка, репликацию ДНК, остановку роста, транскрипционную и посттранскрипционную регуляцию генов и/или истощение, опосредованное антителами (например, посредством ADCC, CDC и т. д.). В некоторых воплощениях активация защитного выключателя приводит к гибели клетки, в которой был активирован защитный выключатель. В некоторых воплощениях активация защитного выключателя приводит к снижению активности клетки, в которой был активирован защитный выключатель, при этом клетка может быть повторно активирована в будущем. В других воплощениях активность клетки по умолчанию снижается, а активация защитного выключателя приводит к повышению активности клетки, при этом клетка может быть дезактивирована в будущем.

В некоторых воплощениях, защитные выключатели, описанные в настоящем документе, включают рецепторы, способные быть мишенью для антител или фрагментов антител, примеры таких рецепторов включают EPCAM, VEGFR, интегрины (например, интегрин $\alpha v \beta 3$, $\alpha 4$, $\alpha 3 / 4 \beta 3$, $\alpha 4 \beta 7$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, αv), члены суперсемейства рецепторов TNF (например, TRAIL-R1, TRAIL-R2), рецептор PDGF, рецептор интерферона, рецептор фолиевой кислоты, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, рецептор IL-6, 5T4, GD2, GDB, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, рецептор CD23/IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/базиджин, CD152/CTLA-4, CD154/ CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7 и EGFR и их укороченные формы

(например, формы, которые сохраняют один или несколько внеклеточных эпитопов, но лишены одной или нескольких областей в цитоплазматическом домене) и т.д. Защитные выключатели, подходящие для применения в настоящей заявке, известны в данной области техники, и их предпочтительные примеры включают, но не ограничиваются, например, каспазой 9 (iCaspase-9), iCaspase-1, iCaspase-8, тимидинкиназой (например, HSV-ТК, VZV-ТК), цитозиндезаминазой (CD), CD20, укороченные EGFR (tEGFR), FR806, RQP8 или любые их комбинации.

Как известно в данной области техники, различные типы защитных выключателей могут быть активированы и/или распознаны различными экзогенными молекулами. В некоторых воплощениях защитный выключатель активируется экзогенной молекулой (например, пролекарством), которая запускает апоптоз и/или гибель клеток в терапевтической клетке при активации. В других воплощениях защитный выключатель распознается молекулой (например, антителом), способной вызывать гибель клеток (например, ADCC или гибель клеток, вызванную комплементом). В некоторых воплощениях, когда защитный выключатель представляет собой iCaspase-9, то может быть введен димеризующий препарат, который приводит к активации iCaspase-9 и апоптозу. Молекула iCaspase-9 включает домен связывания химически индуцированных димеризаторов (CID), который опосредует димеризацию в присутствии CID. Это приводит к индуцируемому и селективному истощению клеток, экспрессирующих CAR. В других воплощениях, для рекомбинантных клеток, включающих укороченный EGFR, хотя tEGFR не обладает способностью к передаче сигнала, он сохраняет эпитоп, распознаваемый молекулами, способными индуцировать ADCC (например, цетуксимабом), таким образом, введение цетуксимаба в рекомбинантные клетки приводит к ADCC и последующему истощению рекомбинантных клеток. Для рекомбинантных клеток, включающих CD20, введение ритуксимаба может разрушить рекомбинантные клетки. В других воплощениях, рекомбинантные клетки включают HSV-ТК, который вызовет гибель клеток при контакте с ганцикловиром. В некоторых других воплощениях экзогенные молекулы, способные активировать и/или распознавать защитные выключатели, включают ганцикловир (GCV), ацикловир (ACV), бромвинилдезоксисуридин (BVDU), 6-метоксипурина арабинозид (AraTP), 5-фторцитозин (5-Fc), AP20187, AP1903, тамоксифен, такролимус и т.д.

Как применено в настоящем документе, термин «репортерный ген» относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей репортерную молекулу. «Репортерная молекула» относится к веществу, обнаруживаемому в любой из множества систем обнаружения, которые могут быть применены для идентификации потенциально трансфицированных клеток. В одном воплощении репортерные молекулы включают, но не

ограничиваются, люциферазу, β -галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), щелочную фосфатазу (AKP), флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP или EGFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), красный флуоресцентный белок (RFP) или другие репортерные молекулы, известные в данной области техники. В другом воплощении в качестве репортерной молекулы также может быть применен tEGFR.

Как применено в настоящем документе, «идентичность» относится к степени сходства между аминокислотными последовательностями или между нуклеотидными последовательностями, устанавливаемой с помощью программного обеспечения для выравнивания последовательностей, такого как BLAST. Например, в настоящей заявке, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности включает, например, по меньшей мере, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности.

Как применено в настоящем документе, термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству фармацевтической композиции, включающей один или более пептидов, белков, нуклеиновых кислот или их мутантов, вариантов, аналогов или производных, раскрытых в настоящей заявке, и пациент или субъект, получающий «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» фармацевтической композиции, может получить разумное соотношение пользы и риска медицинского лечения, тем самым облегчая или предотвращая, по меньшей мере, один или более симптомов заболеваний или состояний, достигая желаемого терапевтического или профилактического эффекта.

Как применено в настоящем документе, термин «около» относится к нормальному диапазону ошибок для различных значений, хорошо известных специалистам в данной области техники. Ссылка на «около» значения или параметра включает (и описывает) воплощение для самого этого значения или параметра. Как применено в настоящем документе, термин «около», стоящий перед численным значением, означает в пределах 10% выше или ниже числового значения. Например, «около 100» охватывает 90 и 110.

Как применено в настоящем документе, формы единственного числа включают формы множественного числа, если не указано иное.

Если в настоящем документе не определено иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Сконструированные клетки или рекомбинантные клетки

В одном аспекте настоящая заявка предлагает рекомбинантную клетку, включающую следующую функциональную структуру:

1) химерный антигенный рецептор (CAR) или кодирующая его нуклеиновая кислота, в котором CAR включает внеклеточную область, трансмембранную область и внутриклеточную область, в которой внеклеточная область включает структурные домены D1 и D2 молекулы человеческого CD4;

2) кшРНК или кодирующая ее нуклеиновая кислота нацелены на один или несколько генов хозяина или генов ВИЧ, участвующих в жизненном цикле ВИЧ, выбранных из группы, состоящей из NF-κB, CCR5, TSG101, CXCR4, P-TEFb, tat, rev, nef, env, LTR и gag.

В некоторых воплощениях, рекомбинантные клетки получают из клеток рецепторов ВИЧ или моноклеарных клеток периферической крови. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из лимфоцитов. В некоторых воплощениях, рекомбинантные клетки получают из Т-клеток. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из наивных Т-клеток, Т-клеток памяти или эффекторных Т-клеток. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из цитотоксических Т-клеток, Т-хелперных клеток или регуляторных Т-клеток. В других воплощениях, Т-клетки получают из CD4⁺ Т-клеток или CD8⁺ Т-клеток. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из НКТ-клеток. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из γδ Т-клеток. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из НК-клеток. В других воплощениях, рекомбинантные клетки получают из антигенпрезентирующих клеток, таких как макрофаги и дендритные клетки.

В некоторых воплощениях, рекомбинантные клетки получают из клеток-предшественников или стволовых клеток. В некоторых воплощениях изобретения, клетки-предшественники или стволовые клетки включают гемопоэтические стволовые клетки (например, клетки CD34⁺) или гемопоэтические клетки-предшественники. В других воплощениях настоящего изобретения стволовые клетки включают стволовые клетки памяти Т, такие как центральные клетки памяти Т, эффекторные клетки памяти Т или стволовые клетки памяти Т. В другом воплощении изобретения, стволовые клетки индуцируются для дифференциации в любую из Т-клеток, как описано ранее. В некоторых воплощениях, рекомбинантные клетки получают от пациентов, инфицированных ВИЧ. В некоторых воплощениях, рекомбинантные клетки получают от здоровых групп населения.

Специалисты в данной области должны знать, что гены, вовлеченные в жизненный цикл ВИЧ, включают его структурные и регуляторные гены, регуляторные элементы и некоторые гены клетки-хозяина. Вмешательство или ингибирование любого этапа жизненного цикла ВИЧ может повлиять на его репликацию и пролиферацию. Однако трудно предсказать, какой ген или гены среди них следует вовлечь во вмешательство или

ингибирование, чтобы успешно достичь этого эффекта, и создать баланс между анти-ВИЧ эффектом и нормальной физиологической функцией клетки-хозяина. Например, трудно извлечь из предшествующего уровня техники, способ, позволяющий минимизировать инфицирование клеток ВИЧ, уменьшить и отсрочить истощение рекомбинантных клеток, сохраняя при этом способность настоящего применения уничтожать рекомбинантные клетки, насколько это возможно.

Известно, что геном ВИЧ состоит, по меньшей мере, из семи регуляторных элементов (LTR, TAR, RRE, PE, SLIP, CRS и INS) и девяти генов (*gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu* и иногда есть десятый ген, *tev*, который представляет собой слияние *tat*, *env* и *rev*) и кодирует в общей сложности 19 белков. Три из этих генов, *gag*, *pol* и *env*, содержат информацию, необходимую для создания структурных белков новых вирусных частиц. *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* и *vpu* (*vpx* в случае ВИЧ-2) представляют собой регуляторные гены для белков, которые контролируют способность ВИЧ инфицировать клетки, производство новых вирусных копий, репликацию вируса или вызывать заболевание. Регуляторные элементы взаимодействуют с регуляторными белками экспрессии генов, участвуют в транскрипции генома, трансляции и других процессах или мешают нормальной физиологической активности клеток-хозяев. Кроме того, гены, участвующие в жизненном цикле ВИЧ, также включают некоторые гены хозяина, такие как NF-κB, CCR5, TSG101, CXCR4, P-TEFb и т.п. Таким образом, введение кшРНК, способной воздействовать на эти гены и ингибировать их, может помешать репликации и распространению ВИЧ и уменьшить ущерб, наносимый клеткам-хозяевам.

Следовательно, в некоторых воплощениях, кшРНК, которые ингибируют один или несколько генов хозяина или генов ВИЧ, участвующих в жизненном цикле ВИЧ, включены в рекомбинантную клетку, нацеленную на ген *gag* и ген LTR ВИЧ. В некоторых воплощениях кшРНК нацелены на *gag* и *nef* ВИЧ.

В некоторых воплощениях, последовательность нуклеиновой кислоты кшРНК, нацеленная на *gag*, включает последовательность SEQ ID NO: 1 или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях, последовательность нуклеиновой кислоты кшРНК, нацеленная на LTR включает последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая кшРНК, нацеленная на *gag*, включает последовательность SEQ ID NO: 3 или последовательность нуклеиновой кислоты,

имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 3. В некоторых воплощениях, последовательность нуклеиновой кислоты кшПНК, нацеленная на LTR, включает последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 2. В некоторых воплощениях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая кшПНК, нацеленная на LTR, включает последовательность SEQ ID NO: 4 или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 4.

В некоторых воплощениях, последовательность нуклеиновой кислоты кшПНК, нацеленная на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 5. В некоторых воплощениях, последовательность нуклеиновой кислоты кшПНК, нацеленная на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 6 или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 6. В некоторых воплощениях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая кшПНК, нацеленная на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 7 или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7. В некоторых воплощениях, последовательность нуклеиновой кислоты кшПНК, нацеленная на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 6 или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 6. В некоторых воплощениях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая кшПНК, нацеленная на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 8 или последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 8.

В некоторых воплощениях настоящей заявки, промотор H1 выбран в качестве промотора кшПНК, нацеленной на gag, и промотор U6 выбран в качестве промотора кшПНК, нацеленной на LTR или nef, и были достигнуты благоприятная транскрипция и стабильность для каждой кшПНК. В некоторых воплощениях нуклеотидные последовательности промотора H1 и промотора U6 показаны в SEQ ID NO: 9 и 10, соответственно, или имеют, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9 и 10, соответственно.

В некоторых воплощениях, внеклеточная область CAR в рекомбинантной клетке включает структуру, выбранную из следующих структур: домен D1 молекулы CD4 человека, домены D1 и D2 молекулы CD4 человека, домен D1-D3 молекулы CD4 человека, домен D1-D4 молекулы CD4 человека, антитело, специфически связывающееся с ВИЧ, или его антигенсвязывающий фрагмент. Как применено в настоящем документе, термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают Fab, Fab', F(ab')₂, Fv-фрагмент, диатело, линейное антитело и scFv. В настоящей заявке примеры ВИЧ-специфического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают gp120-связывающее специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Как применено в настоящем документе, термин «scFv» (одноцепочечный переменный фрагмент антитела) относится к домену белка или белку, включающему только переменные области тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей, где VH и VL могут быть соединены через линкерный пептид. scFv может быть выражен как одноцепочечный полипептид. scFv сохраняют специфичность интактного антитела, из которого они получены. Легкая цепь и тяжелая цепь могут быть расположены в любом порядке, например, VH-линкер-VL или VL-линкер-VH, при условии сохранения специфичности scFv к целевому антигену. В некоторых особых воплощениях линкеры могут быть опущены. В некоторых воплощениях форма scFv моноклонального антитела анти-gp120 представляет собой NAb-scFv (способ его построения показан в патенте CN103797029B). В некоторых воплощениях, NAb-scFv включает последовательность SEQ ID NO:15.

В некоторых предпочтительных воплощениях настоящей заявки, внеклеточная область включает домены D1 и D2 молекулы CD4 человека, но не включает домены D3 и D4. В некоторых конкретных воплощениях внеклеточная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности с аминокислотной последовательностью. ВИЧ может проникать в Т-клетки хозяина посредством специфического связывания его оболочечного белка gp120 и CD4. Применяя специфическое связывание, CD4 или его часть, которая имеет специфическую связывающую способность с gp120, можно применять в качестве специфического домена распознавания антигена CAR.

В некоторых воплощениях, трансмембранную область, включенная в рекомбинантную клетку, получают из трансмембранного домена или она включает трансмембранный домен одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы,

состоящей из α -, β - или ζ -цепей рецепторов Т-клеток, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1(CD11a, CD18), ICOS(CD278), 4-1BB(CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM(LIGHTR), SLAMF7, NKp80(KLRF1), CD160, CD19, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D4, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100(SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, NKG2C. В некоторых конкретных воплощениях, трансмембранную область получают из трансмембранного домена молекулы белка CD8 α или она включает его. В некоторых конкретных воплощениях, трансмембранная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 18.

В некоторых воплощениях, внутриклеточная область рекомбинантной клетки включает первичный сигнальный домен. В некоторых воплощениях, первичный домен сигнальной трансдукции включает иммунорецепторные мотивы активации на основе тирозина (ITAM, их базовый состав: YXXL/V, где Y представляет собой тирозин, L/V относится к лейцину или валину, а X может быть любой аминокислотой). В некоторых воплощениях первичный домен сигнальной трансдукции получают из домена сигнальной или он включает домен сигнальной трансдукции одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы, состоящей из: CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , FCER1G, Fc ϵ R1b, CD79a, CD79b, Fc γ RIIa, DAP10 и DAP12. В некоторых воплощениях, первичный сигнальный домен получен из сигнального домена CD3 ζ или включает его. В некоторых воплощениях, первичный сигнальный домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23.

В некоторых воплощениях, внутриклеточная область дополнительно включает костимулирующий домен, полученный из домена сигнальной трансдукции или включающий домен сигнальной трансдукции одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы, состоящей из: CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов, которые специфически связываются с CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80, CD160, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c,

ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1, SLAMF4, CD84, CD96, CEACAM1, CRTAM, Ly9, CD160, PSGL1, CD100, CD69, SLAMF6, SLAM, BLAME, SELPLG, LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, DAP10. В некоторых воплощениях, костимулирующий домен включает сигнальный домен CD137, CD28+CD137 или CD137+DAP10.

В некоторых воплощениях, внутриклеточная область включает сигнальные домены CD3 ζ и CD137. В некоторых воплощениях, внутриклеточная область включает сигнальные домены CD3 ζ , CD28 и CD137. В некоторых воплощениях, внутриклеточная область включает сигнальные домены CD3 ζ , CD137 и DAP10. В некоторых воплощениях, внутриклеточная область включает сигнальные домены CD28, DAP10 и CD3 ζ . В некоторых воплощениях, внутриклеточная область включает сигнальные домены 2B4, DAP10 и CD3 ζ . В некоторых воплощениях, внутриклеточная область включает сигнальные домены CD137, 2B4 и CD3 ζ .

В некоторых воплощениях, линкерный пептид также включен во внутриклеточной области между первичным доменом сигнальной трансдукции и костимулирующим доменом, а также между каждым костимулирующим доменом. Линкерный пептид может быть выбран из любых природных или синтетических пептидов, которые могут соединять различные структурные домены во внутриклеточной области и поддерживать определенное относительное пространственное расстояние между структурными доменами для обеспечения их функциональной целостности и сигнальной трансдукции между ними. Необязательные линкерные пептиды известны специалистам в данной области техники и могут быть применены в сочетании с альтернативными воплощениями изобретения. В некоторых конкретных воплощениях линкерный пептид представляет собой линкер GS, такой как (GGGS) n , где n выбирают из любого натурального числа. В некоторых конкретных воплощениях линкерный пептид представляет собой GGGGS.

В некоторых конкретных воплощениях настоящей заявки, внутриклеточная область включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 28-34 или включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98% и 99% идентичности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 28-34.

В некоторых воплощениях, внеклеточная область соединена с трансмембранной областью шарнирной областью. Шарнирная область, описанная в настоящей заявке, может быть выбрана из шарниров, содержащихся в природных белках, а также может быть выбрана из искусственно синтезированных шарнирных областей, таких как линкеры GS. В некоторых воплощениях настоящей заявки, шарнирную область получают из шарнирной

области или она включает шарнирную область человеческого Ig, линкер GS, шарнир KIR2DS2 или шарнирную область CD8. В некоторых воплощениях шарнирная область представляет собой шарнирную область CD8 α . В некоторых конкретных воплощениях, шарнирная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 20.

В некоторых воплощениях, CAR в рекомбинантной клетке по настоящей заявке дополнительно включает сигнальный пептид, который локализует CAR на клеточной мембране рекомбинантной клетки. В некоторых воплощениях, после того как сигнальный пептид направляет белок для завершения его локализации, сигнальный пептид вырезается под действием сигнальной пептидазы. Следовательно, связывание сигнального пептида, описанное в настоящей заявке, включает связывание сигнального пептида с CAR в любой момент жизненного цикла клетки. В некоторых воплощениях сигнальный пептид получают из сигнального пептида или он включает сигнальный пептид любых секреторных белков или мембранных белков. В некоторых воплощениях, сигнальный пептид получают из сигнального пептида CD4 или CD8 или включает его. В некоторых воплощениях сигнальный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 17 или включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 16 или 17.

В некоторых конкретных воплощениях, внутриклеточная область CAR включает аминокислотную последовательность, выбранную из любой из последовательностей SEQ ID NO: 28-34 или включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности любой из последовательностей SEQ ID NO: 28-34.

В некоторых конкретных воплощениях, CAR включает аминокислотную последовательность, выбранную из любой из последовательностей SEQ ID NO: 35-46 или включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности любой из последовательностей SEQ ID NO: 35-46.

В некоторых конкретных воплощениях, рекомбинантная клетка включает кШРНК, нацеленную на gag и LTR соответственно, или кодирующую ее нуклеиновую кислоту, сигнальный пептид CD4, домен D1 и D2 CD4, шарнирную область CD8 α , трансмембранную область CD8 α , домен сигнальной трансдукции CD137 и домен сигнальной трансдукции CD3 ζ .

В некоторых конкретных воплощениях, рекомбинантная клетка включает кшРНК, нацеленную на gag, и LTR соответственно, или кодирующую ее нуклеиновую кислоту, сигнальный пептид CD4, домен D1 и D2 CD4, шарнирную область CD8 α , трансмембранную область CD8 α , домен сигнальной трансдукции CD28, домен сигнальной трансдукции CD137 и домен сигнальной трансдукции CD3 ζ .

В некоторых конкретных воплощениях, рекомбинантная клетка включает кшРНК, нацеленную на gag, и LTR, соответственно, или кодирующую ее нуклеиновую кислоту, сигнальный пептид CD4, домен D1 и D2 CD4, шарнирную область CD8 α , трансмембранную область CD8 α , домен сигнальной трансдукции CD28, домен сигнальной трансдукции CD137 и домен сигнальной трансдукции CD3 ζ . Кроме того, домен сигнальной трансдукции CD28, домен сигнальной трансдукции CD137 и домен сигнальной трансдукции CD3 ζ соединены через пептид-линкер GS.

В некоторых конкретных воплощениях, рекомбинантная клетка включает кшРНК, нацеленную на gag, и LTR, соответственно, или кодирующую ее нуклеиновую кислоту, сигнальный пептид CD4, домен D1 и D2 CD4, шарнирную область CD8 α , трансмембранную область CD8 α , домен сигнальной трансдукции CD28, домен сигнальной трансдукции CD137, домен сигнальной трансдукции SLAMF4 (2B4) и/или DAP10 и домен сигнальной трансдукции CD3 ζ .

В некоторых воплощениях, рекомбинантная клетка дополнительно включает репортерную молекулу и/или защитный выключатель.

В некоторых конкретных воплощениях, защитный выключатель выбирают из одного или нескольких из следующих: iCaspase-9, iCaspase-1, iCaspase-8, тимидинкиназа (например, HSV-TK, VZV-TK), цитозиндезаминаза (CD), CD20, tEGFR, FR806 и RQP8. В другом предпочтительном варианте защитный выключатель представляет собой tEGFR, предпочтительно аминокислотная последовательность tEGFR показана в SEQ ID NO: 49 или 50.

В некоторых конкретных воплощениях, репортерную молекулу выбирают из одного или нескольких из следующего: люцифераза, β -галактозидаза, CAT, АКР, GFP или EGFP, YFP, RFP и tEGFR. В другом предпочтительном воплощении репортерная молекула представляет собой, предпочтительно, RFP или tEGFR, предпочтительно, аминокислотная последовательность RFP показана в SEQ ID NO: 48, а аминокислотная последовательность tEGFR показана в SEQ ID NO: 49 или 50.

Химерный антигенный рецептор (CAR) и его комбинации

В другом аспекте настоящая заявка обеспечивает химерный антигенный рецептор,

включающий внеклеточную область, трансмембранную область и внутриклеточную область, в которой внеклеточную область получают из внеклеточной области или она включает внеклеточную область человеческой молекулы CD4, а трансмембранную область получают из трансмембранного домена CD8 α или она включает его.

В предпочтительном воплощении настоящей заявки, химерный антигенный рецептор дополнительно включает шарнирную область, а внеклеточная область связана с трансмембранной областью через шарнирную область. Предпочтительно, шарнирную область получают из шарнирной области или она включает шарнирную область человеческого Ig, линкер GS, шарнир KIR2DS2 или шарнирную область CD8 α , более предпочтительно, шарнирную область CD8 α . В конкретном воплощении настоящей заявки, шарнирная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 20.

В некоторых предпочтительных воплощениях настоящей заявки, внеклеточная область включает домены D1 и D2 молекулы CD4 человека, но не включает домены D3 и D4. В некоторых конкретных воплощениях, внеклеточная область включает аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 13, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 13.

В некоторых воплощениях, трансмембранная область CAR включает аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 18.

В некоторых воплощениях, внутриклеточная область CAR включает первичный сигнальный домен. В некоторых воплощениях, первичный домен сигнальной трансдукции включает иммунорецепторные мотивы активации на основе тирозина (ITAM, их базовый состав: YXXL/V, где Y представляет собой тирозин, L/V относится к лейцину или валину, а X может быть любой аминокислотой). В некоторых воплощениях, первичный домен сигнальной трансдукции получают из домена сигнальной трансдукции или он включает домен сигнальной трансдукции одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы, состоящей из: CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , FCER1G, Fc ϵ R1b, CD79a, CD79b, Fc γ RIIa, DAP10 и DAP12. В некоторых воплощениях, первичный сигнальный домен получали из сигнального домена CD3 ζ или включает его. В некоторых воплощениях, первичный сигнальный домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23.

В некоторых воплощениях, внутриклеточная область дополнительно включает костимулирующий домен, полученный из домена сигнальной трансдукции или

включающий домен сигнальной трансдукции одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы, состоящей из: CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов, которые специфически связываются с CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80, CD160, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1, SLAMF4, CD84, CD96, CEACAM1, CRTAM, Ly9, CD160, PSGL1, CD100, CD69, SLAMF6, SLAM, BLAME, SELPLG, LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, DAP10. В некоторых воплощениях, костимулирующий домен включает сигнальный домен CD137, CD28+CD137 или CD137+DAP10.

В некоторых воплощениях, внутриклеточная область включает сигнальные домены CD3 ζ и CD137. В некоторых воплощениях, внутриклеточная область включает сигнальные домены CD3 ζ , CD28 и CD137. В некоторых воплощениях, внутриклеточная область включает сигнальные домены CD3 ζ , CD137 и DAP10. В некоторых воплощениях, внутриклеточная область включает сигнальные домены CD28, DAP10 и CD3 ζ . В некоторых воплощениях, внутриклеточная область включает сигнальные домены 2B4, DAP10 и CD3 ζ . В некоторых воплощениях, внутриклеточная область включает сигнальные домены CD137, 2B4 и CD3 ζ .

В некоторых воплощениях, линкерный пептид также включают во внутриклеточную область между первичным доменом сигнальной трансдукции и костимулирующим доменом, а также между каждым костимулирующим доменом. Линкерный пептид может быть выбран из любых природных или синтетических пептидов, которые могут соединять различные структурные домены во внутриклеточной области и поддерживать определенное относительное пространственное расстояние между структурными доменами для обеспечения их функциональной целостности и сигнальной трансдукции между ними. Необязательные линкерные пептиды известны специалистам в данной области техники и могут быть применены в сочетании с альтернативными воплощениями изобретения. В некоторых конкретных воплощениях, линкерный пептид представляет собой линкер GS, такой как (GGGGS) n , в котором n выбирают из любого натурального числа. В некоторых конкретных воплощениях, линкерный пептид представляет собой GGGGS.

В некоторых конкретных воплощениях настоящей заявки, внутриклеточная область включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 28-34 или включает аминокислотную

последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98% и 99% идентичности любой из последовательностей SEQ ID NO: 28-34.

В некоторых конкретных воплощениях, CAR включает аминокислотную последовательность, выбранную из любой из последовательностей SEQ ID NO: 35, 36, 43-46 или включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 90%, 93 %, 95%, 97%, 98%, 99% идентичности любой из последовательностей SEQ ID NO: 35, 36, 43-46.

В некоторых конкретных воплощениях, дополнительный сигнальный пептид связан с CAR, и сигнальный пептид получают из сигнального пептида или он включает сигнальный пептид любых секреторных белков или мембранных белков, предпочтительно, сигнальный пептид получают из сигнального пептида или он включает сигнальный пептид CD4 или CD8.

Кроме того, в настоящей заявке также предложена рекомбинантная клетка, включающая химерный антигенный рецептор, описанный выше.

Настоящая заявка далее предлагает комбинацию химерного антигенного рецептора или рекомбинантной клетки, включающей химерный антигенный рецептор и, по меньшей мере, одну нацеленную на ВИЧ кшРНК или кодирующую ее нуклеиновую кислоту или вектор, включающий ее нуклеиновую кислоту, описанные в настоящей заявке.

Нуклеиновые кислоты, векторы и композиции

Настоящая заявка также обеспечивает нуклеиновую кислоту или вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий CAR, и/или кшРНК, включенную в рекомбинантную клетку, как описано выше, или молекулу CAR, как описано выше. В некоторых воплощениях вектор выбирают из плазмид, вирусных векторов или линейных молекул нуклеиновых кислот. В некоторых конкретных воплощениях вектор представляет собой ретровирусный челночный плазмидный вектор, такой как челночный плазмидный вектор вируса иммунодефицита обезьян (SIV). В некоторых воплощениях вектор представляет собой упакованный вирусный вектор SIV. В некоторых воплощениях экспрессия и транскрипция CAR и кшРНК управляются одним промотором. В некоторых воплощениях экспрессия и транскрипция CAR и кшРНК управляются разными промоторами. В некоторых воплощениях полинуклеотиды, кодирующие CAR и кшРНК, содержатся в разных векторах. В некоторых воплощениях полинуклеотиды, кодирующие CAR и кшРНК, включены в один и тот же вектор. В некоторых воплощениях полинуклеотид, кодирующий кшРНК, включен в один и тот же или разные вектора.

Настоящая заявка также обеспечивает композицию, включающую нуклеиновые кислоты или векторы, описанные в настоящей заявке. В некоторых воплощениях

настоящая заявка также обеспечивает липосомы, включающие нуклеиновые кислоты, векторы или композиции.

Фармацевтические композиции и способы лечения

Настоящая заявка также предлагает фармацевтическую композицию, включающую рекомбинантную клетку, молекулу CAR, нуклеиновую кислоту или вектор или комбинацию, как описано выше. Фармацевтическая композиция может быть применена для лечения пациентов, инфицированных ВИЧ. В некоторых воплощениях ВИЧ-инфицированный пациент проходил длительную антиретровирусную терапию. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый вспомогательное вещество, носитель и/или стабилизатор. В некоторых воплощениях подходящие вспомогательные вещества, носители и/или стабилизаторы выбирают из группы, состоящей из антиоксидантов, консервантов, апиrogenной воды, изотонических солевых растворов, фосфатных буферов и т.д. или их комбинаций. Фармацевтически приемлемые носитель, вспомогательное вещество или стабилизатор нетоксичен для реципиентов в примененной дозировке и концентрации и включает, например, буфер, такой как фосфатный, цитратный или ацетатный, имеющий рН, как правило, от 5,0 до 8,0, необязательно от 6,0 до 7,0; изотонические соли, такие как хлорид натрия, хлорид калия и т. д.; антиоксиданты; консерванты; низкомолекулярные полипептиды; белки; гидрофильные полимеры, такие как полисорбат 80; аминокислоты, такие как глицин; углеводы; хелатирующие агенты; сахара; и другие стандартные компоненты, известные специалистам в данной области техники (Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 22th ed., Loyd V. Allen et al., Pharmaceutical Press (2012)).

Фармацевтическая композиция согласно настоящей заявке может быть изготовлена в различных лекарственных формах по мере необходимости и может быть введена врачом в количестве, полезном для пациента, которое может быть определено в соответствии с типом пациента, возрастом, массой тела и общим состоянием заболевания, способом введения и другими факторами. Введение может представлять собой, например, парентеральное введение (например, инъекцию) или другой подход к лечению. Настоящая заявка далее предлагает способ лечения ВИЧ-инфекции, включающий введение субъекту, инфицированному ВИЧ, эффективного количества рекомбинантной клетки, нуклеиновой кислоты или вектора, как описано выше, или комбинации, как описано выше, или фармацевтической композиции, как описано выше. В некоторых воплощениях введение представляет собой внутривенную инъекцию или артериальную инфузию. В некоторых воплощениях эффективное количество определяют в соответствии с тяжестью заболевания, возрастом и физическим состоянием пациента. В некоторых воплощениях

способ лечения ВИЧ-инфекции дополнительно включает введение ВИЧ-инфицированному субъекту эффективного количества рекомбинантных клеток, нуклеиновых кислот или векторов, как описано выше, комбинаций, как описано выше, или фармацевтических композиций, как описано выше, и совместное введение других нуклеозидных ингибиторов, вакцин против ВИЧ, нейтрализующих антител широкого спектра действия и/или CAR-T-клеток против ВИЧ.

Способ получения

Кроме того, в настоящей заявке также предложен способ получения рекомбинантной клетки, как описано выше, который включает введение векторов в клетку, описанную выше, для экспрессии. В некоторых воплощениях вектор представляет собой челночную плазмиду SIV, и способ получения включает упаковку челночной плазмиды SIV в частицы вируса SIV и инфицирование клеток вирусными частицами. В некоторых воплощениях способ получения включает упаковку челночной плазмиды SIV в частицы вируса SIV, инфицирование клеток-предшественников или стволовых клеток вирусными частицами и дальнейшую дифференциацию клеток-предшественников или стволовых клеток в зрелые эффекторные Т-клетки посредством стимуляции цитокином и т.п.

Предпочтительные воплощения настоящего изобретения были подробно описаны выше. Однако настоящее изобретение этим не ограничивается. В рамках технической концепции настоящего изобретения, различные простые модификации могут быть внесены в техническое решение настоящего изобретения, включая комбинирование различных технических признаков любыми другими подходящими способами, и эти простые модификации и комбинации также следует рассматривать как содержание, раскрытое в настоящем изобретении. Все они относятся к объему патентной охраны настоящего изобретения.

Следует понимать, что приведенное выше описание и следующие примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации в пределах объема изобретения будут очевидны для специалистов в области техники, к которой относится изобретение.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Векторная конструкция

Плазмиды, несущие экзогенную кассету экспрессии генов, примененные в примерах настоящей заявки, были сконструированы на основе челночной плазмиды в системе упаковки лентивирусного вектора SIV третьего поколения. Схематические диаграммы важных функциональных структур, вставленных в эту серию плазмид

относительно челночной плазмиды в системе упаковки лентивирусного вектора SIV третьего поколения, показаны на фиг. 1А-1С. Значения структур на фиг. 1А-1С следующие: G3L2 представляет собой кодирующие последовательности кшРНК (последовательности показаны в SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно), нацеленные на консервативные последовательности Gag и LTR в геноме ВИЧ (каждая включает независимый промотор); G2N представляет собой кодирующую последовательность кшРНК (последовательности показаны в SEQ ID NO: 5 и 6), нацеленные на консервативные последовательности Gag и Nef в геноме ВИЧ (каждая включает независимый промотор); Сигнал CD4 представляет собой область сигнального пептида CD4; CD4 D1D2 представляет собой домены D1 и D2 CD4; CD8h указывает на шарнирную область CD8 α ; CD8a TM и CD28TM представляют собой трансмембранные области CD8 α и CD28 соответственно; CD28, CD137, 2B4, CD3 ζ и DAP10 представляют собой домены сигнальной трансдукции из CD28, CD137, 2B4, CD3 ζ и DAP10 соответственно; Nab-scFv представляет собой нейтрализующее антитело scFv (в этом примере использовалось 3BNC117); CCR5&tat/rev указывает на кодирующую последовательность кшРНК, нацеленную на CCR5 и tat/rev. Репортер представляет собой репортерный ген, а репортерный ген, примененный в примерах настоящей заявки, представляет собой улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), красный флуоресцентный белок (RFP) или укороченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR). L представляет собой линкерный пептид GGGGS; L3 представляет собой линкерный пептид (GGGGS)₃. Имеющие отношение последовательности показаны в Таблице 2.

Сначала на основе вектора pGTV-PEDF (фиг. 2А), согласно комбинации, показанной на фиг. 1А-1С, и последовательностей в таблице 2, была получена плазида, несущая структуру Z09, путем синтеза фрагментов нуклеиновой кислоты, бесшовного лигирования и трансформации (фиг. 2Б). После этого на основе указанной плазмиды были сконструированы плазмиды, несущие структуры Z10-Z15, Z17, Z34-Z37 и другие. Серия плазмид, несущих структуру Z01-Z07, была сконструирована на основе серии плазмид, несущих структуру Z09-Z15, где Z01 соответствует Z09, Z02 соответствует Z10, Z03 соответствует Z11, Z04 соответствует Z12, Z05 соответствует Z13, Z06 соответствует Z14 и Z07 соответствует Z15. Разница между плазидами, несущими структуру Z01-Z07, и соответствующими им плазидами заключается в том, что первая не содержит полинуклеотидов, кодирующих кшРНК. Кроме того, разница между Z01/Z02/Z09/Z10 и Z11-Z15/Z03-Z07 заключается в том, что внеклеточная область, шарнирная область и трансмембранная область первой представляет собой домен D1D2 CD4, шарнирную область CD8 α и трансмембранную область CD8 α , соответственно. Для того чтобы

более наглядно показать разницу между плазмидой и соответствующей ей плазмидой, на фиг. 2С показана карта плазмиды, несущей структуру Z01. Конструкция плазмиды, несущей структуру Z08 и структуру Z16, относится к патенту США US 9,833,480 В2.

Синтез фрагментов нуклеиновой кислоты, бесшовное лигирование, трансформация и другие этапы или способы, примененные в конструировании плазмид, представляют собой общепринятые способы в данной области техники и могут быть применены со ссылкой, например, на J Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 или в соответствии со спецификацией производителя.

Пример 2: Получение рекомбинантного лентивируса на основе вектора SIV

2.1 Упаковка и очистка рекомбинантного лентивируса SIV

Способы построения упаковочного вектора, вектора экспрессии *genv* и вектора экспрессии VSV-G подробно описаны в Примере 1 патента ZL200680012905.4.

Клетки клеточной линии 293T (ATCC, CRL-11268) высевали в количестве 9×10^6 клеток на культуральную колбу T225 (Corning, Cat#431082) и культивировали в 20 мл среды D-MEM («Thermofisher», Cat#11995-065), включавшей 10% фетальной бычьей сыворотки в течение 48-ми часов. Затем культуральную среду заменяли 10 мл предварительно нагретой среды OPTI-MEM («Thermofisher», Cat#31985-070), и клетки были трансфицированы и готовы к применению.

Система трансфекции была подготовлена для каждого флакона культуры T225 соответственно. Сначала 60 мкг челночной плазмиды, полученной в примере 1, 30 мкг упаковочного вектора, 12 мкг вектора экспрессии *genv* и 12 мкг вектора экспрессии VSV-G были растворены в 2,25 мл буфера HBSS для формирования смеси плазмид. Затем, после приготовления раствора CaCl_2 167 нМ, 2,25 мл смеси плазмид были добавлены к 2,25 мл раствора CaCl_2 , приготовленного выше. Раствор был немедленно перемешан вортексом в течение 5 секунд и инкубирован при комнатной температуре в течение 10-15 минут для получения около 4,5 мл растворов, содержащих комплекс плазмидной ДНК- CaCl_2 . Затем раствор добавляли в культуральную колбу, инокулированную клетками, и культивировали в инкубаторе при 37°C, 5% CO_2 в течение 3-х часов. Затем в каждую бутылку добавляли среду DMEM, содержащую 20% FBS, при этом конечная концентрация FBS составляла 10%, и инкубировали в течение ночи в инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO_2 .

Через 20 часов после трансфекции культуральную среду в каждой бутылке для культивирования T225 заменяли 20 мл свежей предварительно нагретой среды DMEM. Через 48 часов после трансфекции супернатант извлекали и фильтровали с помощью фильтра 0,45 мкм для получения первичного фильтрата, который затем концентрировали с

помощью высокоскоростной центрифуги. В особенности, первичный фильтрат помещали в высокоскоростную центрифужную пробирку и центрифугировали при 4°C при 40 000 g в течение 2-х часов. После того, как супернатант был полностью удален из центрифужной пробирки, в каждую центрифужную пробирку добавляли DPBS для покрытия осадка, а затем осадок ресуспендировали для получения рекомбинантного лентивирусного концентрата SIV. Вирусный концентрат можно применять напрямую или криоконсервировать при -80°C для последующего применения после разделения на аликвоты.

2.2 Инфекционный титр рекомбинантного вируса SIV

Клетки 293Т были инфицированы рекомбинантным лентивирусом SIV, полученным в разделе 2.1, и затем соотношение клеток, экспрессирующих репортерный ген или внеклеточную область структуры CAR в клетках 293Т, определяли способом проточной цитометрии, в результате чего получали инфекционный титр рекомбинантного лентивируса SIV (например, см. Kunter et al., Nature Protocol, 2009).

Конкретно, 2×10^4 /лунку клеток 293Т высевали в 24-луночные планшеты за 1 день до заражения. В день заражения среду в каждой лунке заменяли на 0,5 мл предварительно нагретой среды DM («Thermofisher», Cat#11995-065). Для каждого рекомбинантного лентивируса SIV готовили по три лунки, затем в каждую лунку добавляли 0,5, 5 или 50 мкл того же самого концентрата рекомбинантного лентивируса SIV, разведенного в 100 раз в среде DMEM, соответственно, и культивировали в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи. Культуру дополняли свежей средой на второй день после заражения: в каждую лунку добавляли полную среду, содержащую 20% сыворотки в объеме 1:1, и культивировали в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂.

На 3-й день после инфицирования среду из лунки удаляли, каждую лунку промывали один раз 0,5 мл DPBS, а затем добавляли 0,1 мл/лунку фермента TrypLE Express («Thermofisher», Cat# 12605028) для переваривания клеток. В каждую лунку добавляли 1 мл DPBS. Клетки многократно пипетировали для суспендирования в DPBS, переносили в проточные пробирки и центрифугировали при 300 g в течение 5 минут. Супернатант отбрасывали, а клетки ресуспендировали в DPBS. Если репортерный ген представляет собой EGFP или RFP, то сигнал флуоресцентного белка определяли непосредственно с помощью проточной цитометрии (BD Celesta) для получения соотношения положительных клеток. Если репортерный ген представляет собой tEGFR, то иммунофлуоресцентное окрашивание проводили с применением антитела против tEGFR (R&D, FAB9577G-100). Затем иммунофлуоресцентный сигнал детектировали с помощью проточной цитометрии и получали соотношение положительных клеток.

Между тем, поскольку молекула CAR, содержащая CD4 и репортерный ген, была присоединена через P2A к молекуле CAR, это также может быть подтверждено путем обнаружения CD4. Затем применяя антитело против человеческого CD4 (BD, Cat#562424) для проведения иммуофлуоресцентного окрашивания на ресуспендированных клетках DPBS согласно соответствующим инструкциям, получали соотношение положительных клеток с помощью проточной цитометрии для обнаружения флуоресцентного сигнала, конъюгированного с человеческим антителом CD4.

Инфекционный титр рекомбинантного лентивируса SIV рассчитывали по формуле $ME/мл = (F \times N \times D \times 1000) / V$. F представляет собой соотношение положительных клеток; N представляет собой количество клеток в каждой лунке во время инфекции; D представляет собой фактор разбавления исходного раствора; а V представляет собой объем разбавленного вируса, фактически добавленного в каждую лунку. Для того же рекомбинантного лентивируса титры вируса, полученные в каждой лунке, рассчитывали совместно для получения среднего значения, которое применяли в качестве титра инфекции рекомбинантного лентивируса. Рекомбинантный лентивирус SIV-EGFP, полученный путем упаковки челночной плазмиды pGTV-EGFP, несущей EGFP, применяли в качестве контроля. В таблице 1 показаны результаты инфекционных титров, обнаруженных с применением репортерных генов.

Таблица 1. Инфекционные титры рекомбинантного лентивируса SIV

Название плазмиды	Название рекомбинантного лентивируса SIV	Инфекционный титр (ME/мл)
Z01	SIV-Z01	2,70E+07
Z02	SIV-Z02	3,95E+07
Z03	SIV-Z03	1,25E+07
Z04	SIV-Z04	9,05E+06
Z05	SIV-Z05	3,30E+07
Z06	SIV-Z06	2,43E+07
Z07	SIV-Z07	1,25E+07
Z08	SIV-Z08	3,23E+07
Z09	SIV-Z09	5,41E+07
Z10	SIV-Z10	1,35E+07
Z11	SIV-Z11	8,93E+06
Z12	SIV-Z12	3,70E+07
Z13	SIV-Z13	3,18E+07
Z14	SIV-Z14	6,78E+06
Z15	SIV-Z15	2,99E+07
Z16	SIV-Z16	2,31E+07
Z17	SIV-Z17	2,54E+07
Z34	SIV-Z34	3,96E+07
Z35	SIV-Z35	2,54E+07

Z36	SIV-Z36	2,52E+07
Z37	SIV-Z37	1,34E+07
Z38	SIV-Z38	5,72E+07
Z39	SIV-Z39	1,78E+07
Z40	SIV-Z40	4,23E+07
Z41	SIV-Z41	1,15E+07
pGTV-EGFP	SIV-EGFP	3,09E+08

Пример 3: Экспрессия рекомбинантных белков

3.1 Выявление целевых белков способом вестерн-блоттинга

Каждая плазида по примеру 1 была напрямую трансфицирована в клетки 293Т, и соответствующие клетки собирали через 48 часов после трансфекции. Клетки лизировали путем добавления лизирующего буфера. После центрифугирования получали супернатант. Концентрацию белка в супернатанте количественно определяли с применением способа с БСА. После соответствующего разбавления супернатанта в соответствии с требуемой концентрацией целевой белок был обнаружен с помощью вестерн-блоттинга. В способе обнаружения вестерн-блоттинга в качестве первичного антитела применяли антитело против CD3 ζ (Santa Cruz sc-166275), а в качестве вторичного антитела применяли козы антитела к IgG (H+L) мыши, меченные перекисидазой хрена (Beyotime A0216).

За исключением плазмиды, несущей структуру Z17 без CD3 ζ и контрольной pGTV-EGFP, положительные пятна в положении целевой полосы могли быть обнаружены для всех клеточных лизатов, трансфицированных другими плазидами (данные не показаны). Это указывало на то, что все кассеты экспрессии плазмиды были успешно сконструированы.

3.2 Обнаружение белков на поверхности или внутри клеток с помощью проточной цитометрии

Каждый рекомбинантный лентивирус SIV, полученный в примере 2, применяли для заражения клеток 293Т в том же объеме с исходным инфекционным титром. Через 48 часов определяли соотношение положительных клеток по способу, описанному по примеру 2. То есть после иммунофлуоресцентного окрашивания клеток 293Т антителом против человеческого CD4 (BD, Cat#562424) конъюгированный флуоресцентный сигнал определяли с помощью проточной цитометрии для получения соотношения положительных клеток. Или сигнал флуоресцентного белка определялся напрямую с помощью проточного цитометра (BD Celesta) для получения соотношения положительных клеток.

Инфицированные клетки 293Т окрашивали иммунофлуоресцентным способом с применением антитела против человеческого CD4, а затем подвергали проточной

цитометрии. Результаты показаны в серых столбцах на фиг. 3: положительные сигналы были обнаружены в клетках, несущих структуру Z09-Z13, Z17, Z34-Z37, Z01-Z05 или Z38-Z41, поскольку эти структуры включали внеклеточную область CD4. Однако Z06-07 и Z14-Z15 не содержали структуру внеклеточной области CD4, никакого положительного сигнала не было обнаружено при окрашивании антителом против человеческого CD4.

Результаты обнаружения с помощью гена-репортера, представляющего собой красный флуоресцентный белок (RFP), экспрессируемого таким образом, показаны в черных столбцах на фиг. 3. Положительные сигналы гена-репортера могли быть обнаружены во всех клетках 293T, инфицированных этими рекомбинантными лентивирусами SIV. И, как показано на фиг. 3, можно обнаружить, что в клетках, несущих структуры Z09-Z13, Z16-Z17, Z34-Z37, Z01-Z05, Z38-Z41, соотношения положительных клеток, показанные двумя цветами, были последовательными. Результаты показали, что при данных условиях обнаружения клетки с двумя положительными сигналами (экспрессия CD4 и гена-репортера), которые могут быть обнаружены одновременно, принадлежали к одной и той же группе клеток и их соотношения также были эквивалентны. Следовательно, экспрессия флуоресцентного белка может указывать на экспрессию структуры CAR на поверхности клетки.

Когда tEGFR был выбран в качестве репортерного гена, для проведения проточной цитометрии после окрашивания применяли антитело против человеческого CD4 и/или антитело против tEGFR. Взяв Z09 в качестве примера, положительные сигналы были также обнаружены в клетках, несущих вышеуказанные структуры (фиг. 4). На фиг. 4А показан результат двойного окрашивания двумя антителами, на фиг. 4В показан результат одинарного окрашивания антителом против CD4, на фиг. 4С показан результат одинарного окрашивания антителом против EGFR и на фиг. 4D показан результат неокрашенных рекомбинантных лентивирусных клеток SIV-Z09, трансдуцированных в качестве контроля. CD4⁺ относится к соотношению положительных клеток, полученных с помощью проточной цитометрии и анализа 293T, трансдуцированного рекомбинантным лентивирусом SIV-Z09 с применением флуоресцентно-конъюгированного антитела против человеческого CD4, а EGFR⁺ относится к соотношению положительных клеток, полученных с помощью проточной цитометрии и анализа 293T, трансдуцированного рекомбинантным лентивирусом SIV-Z09 с применением флуоресцентно-конъюгированного антитела против человеческого EGFR. Результаты показали, что при данных условиях обнаружения дважды окрашенные положительные клетки принадлежали к одной и той же группе клеток. Приведенные выше результаты показали, что как внеклеточная область CD4, так и tEGFR были правильно экспрессированы на поверхности

клетки, поэтому экспрессия tEGFR может указывать на экспрессию структуры CAR на поверхности клетки.

Пример 4: Функциональная проверка модифицированных первичных клеток

4.1 Подготовка первичных клеток

4.1.1 Получение клеток PBMC

Ficoll-Paque PLUS (GE, Cat#17-1440-02) применяли для отделения клеток PBMC от цельной крови с антикоагуляцией EDTA (кровь, сданная здоровыми добровольцами) в соответствии с инструкциями к набору. В особенности, кровь центрифугировали при 800 g в течение 30 минут с применением высокоскоростной охлаждаемой центрифуги (thermo Scientific Sorvall ST40R), фактор увеличения скорости центрифугирования был установлен на 3, фактор уменьшения скорости был равен 0, а температура составляла 20°C. После центрифугирования слой клеток PBMC был осторожно отделен и помещен в новую центрифужную пробирку. PBMC промывали 3-5-кратным объемом DPBS, а затем центрифугировали при 20°C и 300 g в течение 10 минут. После центрифугирования супернатант удаляли и предварительно охлажденный лизат эритроцитов (Tianjin Naoyang NH4CL2009) добавляли к клеточному осадку и клеточный осадок помещали при 4°C на 2 минуты для лизиса эритроцитов. Затем добавляли предварительно охлажденный DPBS, чтобы общий объем составил 40-45 мл, клетки смешивали пипетированием и центрифугировали при 300g, 4°C в течение 10 минут для получения клеток PBMC.

4.1.2 Сортировка CD3+ Т-клеток:

CD3+ Т-клетки очищали с применением набора Dynabeads untouched человеческих Т-клеток («Thermofisher» 11344D) в соответствии с инструкциями производителя. В особенности, клетки PBMC, полученные на предыдущем этапе, ресуспендировали в предварительно охлажденном буфере разделения 4°C (буфер DPBS, включающий 0,1% BSA и 2 mM EDTA) с конечным объемом 300 мкл, смешивали пипетированием несколько раз и помещали на лед. 10 мкл раствора применяли для подсчета живых клеток. В соответствии с подсчетом жизнеспособных клеток количество клеток PBMC доводили до 1×10^8 клеток/мл с помощью предварительно охлажденного буфера разделения 4°C, и рассчитывали соответствующий объем необходимых реагентов, и реагенты добавляли в соответствии с инструкциями набора Dynabeads.

Рассмотрим в качестве примера 5×10^7 клеток PBMC: Сначала 0,5 мл клеток PBMC с указанной выше концентрацией добавляли в центрифужную пробирку объемом 15 мл. Также добавляли 100 мкл предварительно охлажденной FBS и перемешивали. Затем добавляли 100 мкл предварительно охлажденной смеси антител, перемешивали пипетированием несколько раз и инкубировали при 4°C в течение 20 минут в темноте.

Затем добавляли 4 мл предварительно охлажденного буфера для разделения, перемешивали пипетированием несколько раз, центрифугировали при 350 g в течение 8 минут при 4°C и супернатант отбрасывали. Для ресуспендирования клеток добавляли 500 мкл буфера для разделения. Также добавляли 500 мкл предварительно промытых Dynabeads и инкубировали в течение 15 минут на миксере Hula (18-25°C, угол 89, скорость 10, вибрация 2-3). После инкубации добавляли 5 мл буфера для разделения и перемешивали путем осторожного пипетирования 5 раз. 15-мл центрифужную пробирку, содержащую смесь, помещали на магнитный штатив и после отстаивания в течение 2 минут супернатант отбирали в новую 15-мл центрифужную пробирку.

5 мл буфера для разделения снова добавляли в исходную центрифужную пробирку объемом 15 мл, которая содержала Dynabeads, повторяя описанную выше операцию. После тщательного перемешивания центрифужную пробирку объемом 15 мл помещали на магнитный штатив и оставляли на 2 минуты. Затем супернатант отбирали и смешивали с супернатантом, полученным на предыдущем этапе, при комнатной температуре для получения Т-клеток CD3+, и подсчитывали количество клеток. Т-клетки CD3+ центрифугировали и ресуспендировали в среде X-vivo 15 (Lonza BE02-060F).

4.1.3 Активация Т-клеток

Т-клетки активировали с помощью магнитных шариков, покрытых антителами анти-CD3 и анти-CD28, следуя инструкциям набора Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 for T-Cell Expansion and Activation («Thermofisher», 11131D). Сначала, в соответствии с результатами подсчета Т-клеток CD3+, клетки смешивали с предварительно промытыми магнитными шариками CD3/CD28, каждый из которых содержал 1×10^6 клеток на 25 мкл магнитных шариков с исходной концентрацией. К клеткам добавляли IL-2 (R&D 202-IL-010), IL-7 (R&D 207-IL-025) и IL-15 (R&D 247-ILB-025) и человеческий сывороточный альбумин с конечной концентрацией 3-5% или человеческую сыворотку АВ или аутологичную сыворотку, из которой были выделены CD3 + Т-клетки, и тщательно перемешивали (регистрировали как день 0 после активации) и культивировали при 37°C в течение 48-ми часов.

Смесь клеток и магнитных шариков помещали в центрифужную пробирку объемом 15 мл, встряхивали при 2000 об/мин в течение 30 секунд и помещали на магнитный штатив на 1 минуту. Супернатант отсасывали в новую центрифужную пробирку, клетки ресуспендировали в среде X-vivo 15 и центрифугировали при 300 g в течение 5 минут. После центрифугирования супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в свежей среде X-vivo 15, часть которой брали для подсчета и проточной цитометрии (день 2 после активации).

4.1.4 Определение соотношения клеток:

Подмножества CD3+, CD3+CD4+ двойных положительных, CD3+CD8+ двойных положительных, CD3+CD25+ двойных положительных клеток и их соотношения определяли с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии. В особенности, согласно результатам подсчета, 1×10^6 клеток были взяты и центрифугированы при 300g в течение 5 минут при комнатной температуре, а затем ресуспендированы в DPBS. Добавляли многоцветный окрашивающий буфер (BD Horizon Brilliant Stain Buffer Plus, 566385) и комбинацию мышиных антител против человеческого CD3, конъюгированных с PE-CY7 (BD, 557851), мышиных антител против человеческого CD4, конъюгированных с BV421 (BD, 562424) и мышиных антител против человеческого CD8, конъюгированных с PE (BD, 555367) или комбинацию мышиных антител против человеческого CD3, конъюгированных с PE-CY7 (BD, 557851) и мышиных антител против человеческого CD25, конъюгированных с BV421 (BD, 562442). Проводили проточную цитометрию и подсчитывали соотношения подмножеств клеток CD3+, CD3+CD4+ дважды положительных, CD3+CD8+ дважды положительных, CD3+CD25+ дважды положительных. Соотношение активированных клеток относится к соотношению клеток CD3+CD25+ в Т-клетках CD3+ и Т-клетках CD3+, не активированных магнитными частицами, а цитокины применяли в качестве контроля.

По результатам детекции и статистического анализа доля активированных клеток в живых CD3+ Т-клетках составила более 91,4% (фиг. 5).

4.2 Вирусная трансдукция и поддержание клеток

Вышеупомянутые активированные CD3+ Т-клетки, жизнеспособность которых была проверена, инокулировали в культуральные планшеты или колбы, покрытые RetroNectin (Takara T100B, 5 мкг/см²). CD3+ Т-клетки инфицировали серией рекомбинантных лентивирусов SIV (SIV-Z01, SIV-Z04, SIV09-SIV17, SIV34-SIV37), полученных в примере 2 (с MOI, не превышающим 5). Через 48 или 72 часа после заражения культуры центрифугировали для удаления исходной культуральной среды. Для ресуспендирования клеток применяли свежую среду X-vivo 15 (Lonza BE02-060F), и плотность клеток доводили до 1×10^6 /мл. Клетки были дополнены IL-2 (R&D 202-IL-010), IL-7 (R&D 207-IL-025) и IL-15 (R&D 247-ILB-025) и человеческим сывороточным альбумином с конечной концентрацией 3-5% или человеческой сывороткой АВ или аутологичной сывороткой, соответствующей CD3+ Т-клеткам. Концентрация цитокинов была скорректирована в соответствии с плотностью клеток и временем роста, обычно конечная концентрация IL-2 составляет 30 МЕ/мл, конечная концентрация IL-7 составляет 5 или 10 нг/мл и конечная концентрация IL-15 составляет 5 или 10 нг/мл. Клетки

подсчитывали и пассировали через день, и плотность клеток была скорректирована до 1×10^6 /мл с помощью свежей среды X-vivo 15 (включающей IL-2, IL-7 и IL-15, конечная концентрация была такой же, как указано выше). С этого момента и до 12 дня после активации определяли и регистрировали плотность и жизнеспособность клеток и подсчитывали общее количество клеток. В качестве контроля применяли Т-клетки CD3+ (EGFP), трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом SIV-EGFP, и Т-клетки CD3+ (CD3), не трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом.

Результаты показывают, что: при текущих условиях культивирования на 12-й день после активации количество клеток превышало исходное в 140–440 раз, а жизнеспособность превышала 80% (фиг. 6А–6Q).

4.3 Эффективность трансдукции и идентификация субпопуляций клеток

На 13-й и 19-й дни после активации трансдуцированные клетки (как применено в настоящем документе, «модифицированные клетки», «трансдуцированные клетки» и «модифицированные Т-клетки» применяли взаимозаменяемо для обозначения CD3+ Т-клеток или их смесей, которые успешно экспрессируют структуру CAR после трансдукции рекомбинантного лентивируса SIV) окрашивали с применением той же комбинации антител, как описано в разделе 4.1.4, и проточная цитометрия использовалась для обнаружения экспрессии CD3, CD4, CD8 и CD25. Также была обнаружена экспрессия репортерного гена, который экспрессировался одновременно с CAR.

На фиг. 7 показано соотношение CAR-позитивных клеток в клетках CD3+ в двух временных точках после активации, 13 дней (фиг. 7А) и 19 дней (фиг. 7В). Этот результат предполагает, что соотношение CAR-позитивных клеток оставалось относительно стабильным с течением времени.

На фиг. 8 показано соотношение клеток CD3+ в общем количестве клеток (фиг. 8А) и соотношение каждой субпопуляции клеток в клетках CD3+ (фиг. 8В) без трансдукции рекомбинантного лентивируса SIV. На фиг. 8А показано соотношение Т-клеток в 3 различных временных точках в течение 19 дней непрерывного культивирования, которое было рассчитано на основе Т-положительных клеток CD3+. На фиг. 8В показано соотношение каждой субпопуляции Т-клеток в 3 различных временных точках в течение 19 дней непрерывного культивирования, при этом соотношение Т-клеток CD4+ снизилось, а соотношение клеток CD8+ увеличилось, что согласуется с результатами, представленными в литературе, т. е. при условии, благоприятствующем росту Т-клеток CD8+, количество Т-клеток CD8+ будет постоянно увеличиваться.

На фиг. 9 показано соотношение каждой клеточной субпопуляции в различные временные точки после трансдукции CD3+ Т-клеток двумя рекомбинантными

лентивирусами (SIV-Z09 и SIV-Z14), несущими различные структуры CAR. Как видно из рисунков, с течением времени соотношение $CD4^+$ Т-клеток в $CD3^+$ клетках, трансдуцированных рекомбинантным лентивирусом SIV-Z09 (фиг. 9А), было выше, чем соотношение $CD4^+$ Т-клеток в $CD3^+$ клетках, трансдуцированных рекомбинантным лентивирусом SIV-Z14 (фиг. 9В), и также было выше, чем соотношение в $CD3^+$ клетках без какой-либо трансдукции (фиг. 8В). Результаты дополнительно доказали, что введенные молекулы CAR были правильно экспрессированы на поверхности мембраны клеток $CD3^+$.

4.4 Эффекты модифицированных Т-клеток, смешанных с клетками-мишенями

Были сконструированы рекомбинантные плазмиды, в которых белок gp120 различных штаммов ВИЧ (AC10.29, NL4-3 или SF162) или человеческий МНСII (DR0401) коэкспрессировались с AcGFP. Серию плазмид трансфицировали в клетки 293F, и клетки получали путем скрининга G418. При этом зеленый флуоресцентный белок AcGFP в плазмиде был коэкспрессирован с gp120 или МНСII с применением P2A. Клетки 293F, трансфицированные пустым вектором AcGFP, применяли в качестве отрицательного контроля. Трансфицированные клетки 293F, коэкспрессирующие МНСII (DR0401) и зеленый флуоресцентный белок AcGFP, служили в качестве функционального контроля для связывания с CD4. Поскольку CD4 может естественным образом связываться с МНСII, функциональный контроль можно применять для оценки влияния модифицированных Т-клеток в примерах этого приложения на клетки, экспрессирующие МНСII.

Согласно эксперименту, ряд модифицированных Т-клеток смешивали с клетками-мишенями 293F, описанными выше, и ряд индикаторов определяли для определения эффекта модифицированных Т-клеток. В особенности, клетки-мишени высевали в 24-луночный планшет с плотностью 1×10^4 клеток/лунку. Стимуляция цитокинов модифицированных Т-клеток прекращалась за 24 часа до эксперимента. На 14-й день после активации Т-клеток модифицированные Т-клетки добавляли в разные лунки при заданном соотношении эффектора и мишени (то есть соотношении количества эффекторных клеток к целевым клеткам 10:1, 3:1 или 1:1), смешивали с клетками-мишенями, и конечный объем жидкости составлял 200 мкл/лунку.

Через 4 часа после смешивания собирали часть супернатанта, в котором определяли высвобождение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с помощью набора для определения нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox 96 (Promega G1780) для определения острой цитотоксической активности $CD8^+$ Т-лимфоцитов в модифицированных Т-клетках каждой экспериментальной группы по отношению к клеткам-мишеням.

Через 24 часа после смешивания собирали супернатант, с которым с помощью

наборов ELISA (BioLegend 430204, 431804 и 430104) определяли высвобождение цитокинов TNF- α , IL2 или IFN- γ , соответственно. Кроме того, одновременно определяли уровни экспрессии нескольких факторов с помощью магнитной панели для анализа цитокинов человека (R&D Luminex Performance Human XL Cytokine Discovery Magnetic Panel (R&D FSCTM18-12)) на приборе Luminex200.

В то же время, т.е. через 24 часа после смешивания, также собирали клетки. Согласно протоколу в разделе 4.3, соотношение клеток, экспрессирующих gp120 или МНСII в клетках CD3- (в основном клетках-мишенях), рассчитывали с помощью окрашивания антителами и проточной цитометрии для определения ингибирующей активности на клетках-мишенях.

Результаты острой убивающей активности CD8+ Т-лимфоцитов в модифицированных Т-клетках каждой экспериментальной группы по отношению к целевым клеткам показали, что через 4 часа после смешивания эффекторных клеток и клеток-мишеней модифицированные Т-клетки (в качестве примера были взяты модифицированные Т-клетки, несущие структуру Z09 или Z10) оказывали специфический эффект уничтожения на клетки-мишени, экспрессирующие белок gp120 различных штаммов ВИЧ (AC10.29, NL4-3, SF162), в зависимости от концентрации (фиг. 12А–12С).

Для высвобождения цитокинов в качестве примера был взят IFN- γ . Результаты показали, что специфическая стимуляция может позволить модифицированным Т-клеткам высвободить цитокины, участвующие в уничтожении (от фиг. 11А до фиг. 11D). Результаты мультиплексного обнаружения цитокинов (фиг. 14А-14J и фиг. 14L) дополнительно подтвердили, что когда модифицированные Т-клетки настоящей заявки были совместно культивированы с клетками-мишенями, экспрессирующими gp120, модифицированные Т-клетки были специфически активированы и секретировали большое количество цитокинов, связанных с цитотоксичностью, тем самым сильно опосредуя лизис целевых клеток. А для модифицированных Т-клеток, несущих структуру Z09 или Z10, например, не было обнаружено значительного высвобождения таких факторов, как IL-6 (фиг. 14K), который в значительной степени связан с цитокиновым штормом, что указывает на то, что побочные эффекты *in vivo*, такие как цитокиновые штормы, с меньшей вероятностью возникнут в будущем.

Результаты ингибирующей активности модифицированных Т-клеток на клетках-мишенях показали, что модифицированные Т-клетки, в которых CD4 был применен как часть CAR, могли специфически ингибировать клетки-мишени, экспрессирующие gp120, когда соотношение эффектора и мишени составляло 3:1 (фиг. 10А-10С), при этом не оказывая очевидного эффекта (фиг. 10D) на клетки-мишени, трансфицированные пустым

вектором AcGFP (клетки, не экспрессирующие gp120). На фиг. 13А-фиг. 13D показаны результаты ингибирующей активности модифицированных Т-клеток на клетках-мишенях при различных соотношениях эффектора и мишени (10:1, 3:1 и 1:1) в зависимости от концентрации. Результаты далее подтвердили, что клетки-мишени, экспрессирующие gp120, могут быть специфически ингибированы клетками CAR-T, которые специфически распознают антиген, применяя внеклеточную область CD4, в то время как модифицированные Т-клетки без домена внутриклеточной сигнальной трансдукции CD3 ζ (то есть Z17, без полной структуры CAR) не оказывали ингибирующего эффекта на клетки-мишени. Для сравнения, эффект уничтожения модифицированных Т-клеток, несущих структуру Z14 или Z34, был слабее, чем у модифицированных Т-клеток, несущих структуру Z09 или Z10; эффект уничтожения модифицированных Т-клеток, несущих структуры Z12 и Z13, также был слабее, чем у модифицированных Т-клеток, несущих структуру Z09. Эффект уничтожения модифицированных Т-клеток, несущих структуру Z11 или Z15, был слабее, чем у модифицированных Т-клеток, несущих структуру Z10; эффект уничтожения модифицированных Т-клеток, несущих структуру Z04, был слабее, чем у модифицированных Т-клеток, несущих структуру Z01. Стоит отметить, что при том же соотношении эффектора и мишени модифицированные Т-клетки, несущие структуру Z09, оказывали более сильное ингибирующее действие на клетки-мишени, экспрессирующие gp120, чем те, которые несут структуру Z14 (фиг. 13А-С). Разница между структурами Z14 и Z09 заключалась в том, что антигенспецифический домен распознавания, включающийся во внеклеточной области структуры Z14, представлял собой scFv 3BNC117, тогда как антигенспецифический домен распознавания Z09 представлял собой сегмент D1-D2 CD4, что позволяет предположить, что CAR-T-клетки, в которых для распознавания антигена был применен сегмент D1-D2 CD4, оказывали более сильное ингибирующее действие на клетки-мишени, экспрессирующие gp120, по сравнению с CAR-T-клетками, в которых для распознавания антигена был применен scFv 3BNC117.

Кроме того, из приведенных выше результатов видно, что ни одна из модифицированных Т-клеток настоящего применения не подавляет и не убивает клетки-мишени, экспрессирующие МНСII (DR0401) (фиг. 12D, 13D). То есть, хотя CD4 может естественным образом связываться с МНСII, исходные клетки, экспрессирующие МНСII *in vivo*, не будут массово убиты модифицированными Т-клетками, экспрессирующими CD4. Предполагается, что причиной может быть то, что сродство CD4 к нескольким типичным gp120 ВИЧ-1 сильнее, чем к МНСII.

Приведенные выше результаты показали специфический эффект структуры CAR в

техническом решении настоящей заявки, и ожидалось, что структура CAR будет иметь относительно низкий риск цитокинового шторма при применении *in vivo* в будущем и не будет уничтожать или ингибировать исходные клетки, экспрессирующие МНСII *in vivo*.

4.5 Моделирование *in vitro* длительного подавления эффектов Т-клеток

Т-клетки активировали, модифицировали и культивировали с применением способов, описанных выше, и стимуляцию цитокинами останавливали на 13-й день после активации на 24 часа. Плотность клеток подсчитывали и корректировали. Затем клетки непрерывно культивировали в присутствии цитокинов до 18-го дня, и стимуляцию цитокинами останавливали снова еще на 24 часа. Уровень экспрессии CD25 на поверхности Т-клеток измеряли (день 19) в соответствии со способом по Разделу 4.1.4, и было подтверждено, что Т-клетка была восстановлена до неактивированного состояния после этой стадии культивирования (фиг. 15).

На 20-й день после активации модифицированные Т-клетки смешивали с клетками-мишенями, применяя тот же способ, что и в Разделе 4.4, для обнаружения и оценки ингибирующего действия модифицированных Т-клеток на клетки-мишени. Через 24 часа после смешивания модифицированных Т-клеток с клетками-мишенями (то есть в первый день после смешивания) часть клеток собирали и применяли иммуноокрашивание антителами и проточную цитометрию клеток для анализа соотношения клеток, экспрессирующих gp120 различных штаммов ВИЧ (AC10.29, NL4-3, SF162), или контрольных клеток, экспрессирующих пустой вектор AcGFP в клетках CD3⁻ (в основном клетки-мишени), и соотношение модифицированных Т-клеток в Т-клетках CD3⁺ для определения ингибирующее действие модифицированных Т-клеток на клетки-мишени и уровень высвобождения цитокинов.

Результат ингибирования модифицированной Т-клетки на целевой клетке показал, что модифицированные Т-клетки, в которых применяли CD4 или его фрагменты в качестве антигенспецифического домена распознавания CAR, могут специфически ингибировать целевые клетки, экспрессирующие gp120 при соотношении эффектора к мишени 3:1 (фиг. 16A-16C), а целевые клетки, введенные с пустым вектором AcGFP, не были существенно затронуты (фиг. 16D). На фиг. 18A-фиг. 18D показано, что ингибирующее действие модифицированных Т-клеток на клетки-мишени при различных соотношениях эффектора и мишени (10:1, 3:1 и 1:1) и модифицированные Т-клетки (несущие структуру Z09 или Z10) оказывали ингибирующее действие на клетки-мишени, экспрессирующие gp120 вируса ВИЧ (фиг. 18A-18C), в зависимости от концентрации, в то время как не было очевидного ингибирующего действия на клетки-мишени, экспрессирующие МНСII, даже при самом высоком соотношении эффектора и мишени

10:1 (фиг. 18D).

Результаты анализа высвобождения цитокинов способом ELISA, в котором в качестве примера применяли IFN- γ , показали, что специфическая стимуляция антигеном может заставить модифицированные Т-клетки высвобождать цитокины, связанные с уничтожением (фиг. 17). Результаты мультиплексного обнаружения цитокинов дополнительно подтвердили высвобождение цитокинов, связанных с уничтожением (фиг. 19A-19J и 19L), а для модифицированных Т-клеток, несущих структуру Z09 или Z10, не было обнаружено очевидного высвобождения IL-6 и других факторов, связанных с цитокиновым штормом (фиг. 19K).

Эти результаты доказали долгосрочный эффект структуры CAR настоящего применения, и ожидалось, что структура CAR будет иметь относительно низкий риск цитокинового шторма при применении *in vivo* в течение длительного времени в будущем, и она не будет уничтожать или ингибировать исходные клетки, экспрессирующие МНСII *in vivo*.

После того, как вышеупомянутые смешанные клетки непрерывно культивировались в течение 9 дней (то есть 9-й день после смешивания), было определено соотношение Т-клеток (то есть процент Т-клеток в Т-клетках CD3⁺), несущих структуру CAR, которая оказывала специфическое воздействие на gp120, и ингибирующее воздействие этих клеток на клетки-мишени.

Результаты показывают, что через 9 дней после смешивания с клетками-мишенями (соотношение эффектор-мишень было 3:1), соотношение модифицированных Т-клеток в CD3⁺ Т-клетках сохранялось на высоком уровне (фиг. 20A-C), который мог продолжать оставаться стабильным или даже увеличиваться по сравнению с первым днем смешивания (результаты не показаны). В то же время, т.е. через 9 дней после смешивания с клетками-мишенями, модифицированные Т-клетки все еще демонстрировали непрерывное ингибирование на клетках-мишенях, клетках-мишенях, экспрессирующих gp120 различных вирусов ВИЧ (фиг. 21A-C) и не показали очевидного ингибирования на клетках-мишенях, трансдуцированных только пустым вектором AcGFP (фиг. 21D).

Кроме того, для модифицированных Т-клеток, несущих структуры CAR (такие как структуры Z09 или Z10), независимо от соотношения эффектор-мишень (10:1, 3:1 или 1:1), их соотношения сохранялись, или даже увеличивались, через 9 дней после смешивания с клетками-мишенями (фиг. 22), и они демонстрировали непрерывное подавление на клетках-мишенях, экспрессирующих gp120 различных вирусов ВИЧ (фиг. 23A-C), в то время как не показали значительного ингибирования на клетках-мишенях, экспрессирующих МНСII с соотношением эффектор-мишень до 10:1 (фиг. 23D).

Приведенные выше результаты дополнительно подтвердили потенциал модифицированных Т-клеток на основе структуры CAR настоящего изобретения для ингибирования инфицированных клеток *in vivo* в течение длительного времени, без существенного вмешательства в функцию исходных Т-клеток CD4+.

Пример 5: Определение активности модифицированных Т-клеток с применением клеток пациентов

Для того чтобы дополнительно доказать эффективность модифицированных Т-клеток, несущих структуру настоящей заявки для лечения инфекции вируса ВИЧ, модифицированные Т-клетки, полученные от пациентов с ВИЧ, были получены в присутствии ингибиторов протеазы. В особенности, Т-клетки выделяли из крови пациентов с ВИЧ58 и в течение 12 дней после этого, ингибитор протеазы Дарунавир этанолат (SelleckChem s1620) или Саквинавир мезилат (Sigma s8451) добавляли в конечной концентрации 10 мкМ в среду, и клетки культивировали в условиях, описанных в разделе 4.2. Через 12 дней добавление ингибитора протеазы прекращали, и культивирование продолжали. День, когда Т-клетки пациента были выделены, культивированы и активированы, считался днем 0, и полученные от пациента CD3+ Т-клетки были модифицированы на 2-й день в соответствии со способом, описанным выше. Со 2-го по 24-й день культуральный супернатант собирали в разные временные точки, и концентрацию p24 в супернатанте определяли соответственно с помощью набора Lenti-p24 rapid titer kit (Takara 632200) в соответствии с инструкциями к набору для количественного определения частиц вируса ВИЧ непрямым путем. Оценивали уничтожающие и ингибирующие эффекты Т-клеток пациентов, модифицированных полными структурами (такими как Z09, Z10, Z34, Z38-Z41 и т. д.) на инфицированные ВИЧ CD4+ Т-клетки у пациентов. В то же время, на 24-й день, путем обнаружения репортерного гена, определяли соотношение модифицированных Т-клеток для оценки защитного эффекта введенной кшРНК на модифицированные Т-клетки.

Результат на фиг. 24А показал, что для модифицированных Т-клеток, несущих как кшРНК, так и CAR-структуры (Z09, Z10, Z12, Z16, Z34, Z38-Z41), вирус p24 в супернатанте не был обнаружен или концентрация вируса p24 была близка к порогу обнаружения в течение всего процесса подготовки и последующего культивирования без ингибиторов протеазы. И модифицированные Т-клетки, несущие структуру Z10, Z12, Z34, Z38-Z41, имели лучший ингибирующий эффект на p24, чем модифицированные Т-клетки, несущие структуру Z16, что указывает на то, что модифицированные Т-клетки с векторами в настоящей заявке имеют лучший уничтожающий и ингибирующий эффект на ВИЧ, чем модифицированные Т-клетки с Z16, с более длительной продолжительностью

эффективности.

При последующем культивировании в отсутствие ингибитора протеазы концентрация вируса p24 в культуральном супернатанте модифицированных Т-клеток (Z02 или Z08), несущих только структуру CAR, но не кшРНК, увеличивалась с 16-го дня после активации, а затем уменьшалась (фиг. 24А). Для модифицированных Т-клеток, несущих только структуру G3L2 кшРНК (CTRL), и модифицированных Т-клеток, несущих структуру Z17 с частично неполным CAR, концентрация вируса p24 в культуральном супернатанте сначала увеличивалась, а затем уменьшалась (фиг. 24А).

Для модифицированных Т-клеток на основе этих структур (CTRL и Z17) пиковая концентрация p24 в культуральном супернатанте появилась на 18–22 день после активации клеток, и пиковая концентрация была ниже, чем у немодифицированных CD3+ Т-клеток (т.е. CD3 на рисунках) в ту же временную точку, в то время как концентрация вирусного p24 в группе немодифицированных CD3+ Т-клеток была обнаружена с 16-го дня после активации и продолжала увеличиваться в последующие дни (фиг. 24А). На основании того, что модифицированные Т-клетки, полученные от здоровых людей, могут ингибировать и уничтожать клетки-мишени, экспрессирующие белок gp120 вируса ВИЧ, что было подтверждено в Примере 4, приведенные выше результаты дополнительно доказали, что модифицированные Т-клетки от пациента с ВИЧ также оказывали убивающее и ингибирующее действие на аутологичные инфицированные клетки.

Результаты на фиг. 24В показывают, что по сравнению с немодифицированными контрольными клетками CD3+ (CD3), через 24 дня после культивирования с Т-клетками от пациентов с ВИЧ, соотношение модифицированных Т-клеток настоящего применения все еще сохранялось на высоком уровне, что указывает на то, что введение кшРНК оказало защитное действие на модифицированные Т-клетки.

Объединяя результаты двух предыдущих разделов, подтвердили, что модифицированные Т-клетки, несущие структуру CAR настоящей заявки, могли бы постоянно и специфически уничтожать и ингибировать ВИЧ-инфицированные клетки, а кшРНК в настоящей заявке имела преимущество защиты и поддержания модифицированных Т-клеток. В особенности, по сравнению с модифицированными Т-клетками, несущими структуру Z16, CAR-Т-клетки настоящей заявки имели более сильный специфический эффект уничтожения ВИЧ-инфицированных клеток и поддерживались бы в течение более длительного периода времени в случае ВИЧ-инфекции.

На основании приведенных выше примеров, всесторонне сравнили способность Т-клеток уничтожать в условиях активации и долгосрочного периода, их устойчивость к

инфицированию вирусом ВИЧ и риск цитокинового шторма, и можно было обнаружить, что модифицированные Т-клетки, несущие структуру Z09, Z10, Z34, Z38-Z41 в настоящем изобретении, имели относительно лучшую всестороннюю эффективность и замечательные преимущества. Одновременно вводя в эффекторные Т-клетки кшРНК, которая может специфически ингибировать консервативную последовательность генома ВИЧ, и структуру CAR, которая нацеливается на вирусные белки ВИЧ, можно сконструировать более прочные и эффективные CAR-Т-клетки, которые нацеливаются на инфицированные ВИЧ клетки и уничтожают их. При сравнении таких CAR-Т-клеток с использованием той же кшРНК, показано, что домены D1 и D2 CD4 имели лучший эффект при выборе в качестве антигенспецифического домена распознавания CAR по сравнению с другими антигенспецифическими доменами распознавания в предшествующем уровне техники или доменом D1-D4 CD4. В случае если антигенспецифические домены распознавания CAR были одинаковыми, выбранная кшРНК, нацеленная на G3L2 (для gag и LTR соответственно) или G2N (для gag и nef соответственно), по сравнению с другими вариантами кшРНК в предшествующем уровне техники, могла бы обеспечить лучшую комплексную эффективность CAR-Т-клеток.

Список последовательностей

Таблица 2: Все последовательности, упомянутые в настоящем документе, были следующими

SEQ ID NO :	Описание последовательности	Последовательности
1	Нуклеотидная последовательность кшРНК для Gag в G3L2 (РНК)	AUAGUAAGAAUGUAUAGCCUUCAAGAGAGGCUAUA CAUUCUUACUAU
2	Нуклеотидная последовательность кшРНК для LTR в G3L2 (РНК)	UGCUUCAAGCUAGUACCAGUUCAAGAGACUGGUAC UAGCUUGAAGCA
3	Нуклеотидная последовательность, кодирующая кшРНК для Gag в G3L2 (DNA)	ATAGTAAGAATGTATAGCCTTCAAGAGAGGCTATACAT TCTTACTAT
4	Нуклеотидная последовательность, кодирующая кшРНК для LTR	TGCTTCAAGCTAGTACCAGTTCAAGAGACTGGTACTA GCTTGAAGCA

	в G3L2 (DNA)	
5	Нуклеотидная последовательность кшРНК для Gag в G2N (РНК)	GUGACAUAGCAGGAACUACUUCAAGAGAGUAGUUC CUGCUAUGUCAC
6	Нуклеотидная последовательность кшРНК для Nef в G2N (РНК)	CACAAGGCUACUUCCCUGAUUCAAGAGAUCAAGGGAA GUAGCCUUGUG
7	Нуклеотидная последовательность, кодирующая кшРНК для Gag в G2N (DNA)	GTGACATAGCAGGAACACTTCAAGAGAGTAGTTCCT GCTATGTCAC
8	Нуклеотидная последовательность, кодирующая кшРНК для Nef в G2N (DNA)	CACAAGGCTACTTCCCTGATTCAAGAGATCAGGGAAAG TAGCCTTGTG
9	Последовательность промотора H1 (ДНК)	GAACGCTGACGTCATCGACCCGCTCCAAGGAATCGCG GGCCCAGTGTCCTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGT GCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGG AGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCT GGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTGG GAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCAC
10	Последовательность промотора U6 (ДНК)	GATCCTACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTTC CCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTG TTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACA AAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATA ATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAA AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTT CGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAA ACACCG
11	Последовательность промотора кшРНК, нацеленной на CCR5, и кшРНК, нацеленной на tat/rev (ДНК)	GCCCGGATAGCTCAGTcGGTAGAGCACAGACTTTAATC TGAGGGTCCAGGGTCAAGTCCCTGTTCCGGGCGCCA
12	кшРНК, нацеленная на CCR5, и кшРНК, нацеленная на tat/rev, и гибкий линкер между	GCCUGGGAGAGCUGGGGAAUUUGUACGUAGGUUCC CCAGCUCUCCCAGGCgguggcaguggcuccggagguucaggaagcg gcgguagugggagcGCGGAGACAGCGACGAAGAGCCUUC UGUCAGAGCGGAGACAGCGACGAAGAGC

	ними (PHK)	
13	Внеклеточная область антигенспецифического распознавания (аминокислотная последовательность, связанная D1 и D2 молекулы CD4)	KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKS IQFHWKNSNQIKILG NQSFLT KGPSKLNDRADSRRLWDQGNFPLIKNLKI SDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLT ESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTW TCTVLQNQKKVEFKIDIVVLA
14	Аминокислотная последовательность D1-D4 CD4	KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKS IQFHWKNSNQIKILG NQSFLT KGPSKLNDRADSRRLWDQGNFPLIKNLKI SDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLT ESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTW TCTVLQNQKKVEFKIDIVVLA FQKASSIVYKKEGEQVEF SFPLAFTVEKLTGSGELWWQAERASSSKSWITFDLKNKE VSVKRV TQDPKLQMGKKLPLHLTPQALPQYAGSGNLT LALAKTGK LHQEVNLVVMRATQLQKNLTCEVWGPTSP KLMLSLKLENKEAKVSKREKAVWVLNPEAGMWQCLLS DSGQVLLESNIKVLPTWSTPV
15	Аминокислотная последовательность NAb-scFv (линкер (GGGGS) ₃ в середине)	DIQMTQSPSSLSASVGDVTITCQANGYLNWYQQRRGK APKLLIYDGSKLERGVPSRFSGRRWGQEYNLTINNLQPE DIATYFCQVYEFVVPGTRLDLKRVAAPGGGGSGGGGS GGGGSQVQLLQSGAAVTKPGASVRVSCEASGYNIRDYFI HWRQAPGQGLQWGWINPKTGQPNPRQFQGRVSLT RHASWDFDTFSFYMDLKALRSDDTAVYFCARQRSYDW DFDVWGSQTQVTVSSASTKGP
16	Аминокислотная последовательность сигнального пептида CD4	MNRGVVFRHLLLVLQLALLPAATQG
17	Аминокислотная последовательность сигнального пептида CD8	MALPVTALLLPLALLHAARP
18	CD8 α TM amino acid sequence	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
19	Аминокислотная последовательность CD28 TM	KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
20	Последовательность аминокислот шарнирной области CD8	AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACD
21	Аминокислотная последовательность L3	GGGGSGGGGSGGGGS

22	Аминокислотная последовательность L	GGGGS
23	Аминокислотная последовательность домена сигнальной трансдукции CD3ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
24	Аминокислотная последовательность домена сигнальной трансдукции CD137 (4-1BB)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CEL
25	Аминокислотная последовательность домена сигнальной трансдукции CD28	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRS
26	Аминокислотная последовательность домена сигнальной трансдукции DAP10	LCARPRRSPAQDGKVIYNMPGRG
27	Аминокислотная последовательность домена сигнальной трансдукции 2B4	WRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQT P GGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRK RNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYS
28	Внутриклеточная область аминокислотной последовательности Z01/Z04/Z05/Z06 /Z09/Z12/Z13/Z14/Z38 (CD137+CD3ζ)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR
29	Внутриклеточная область аминокислотной последовательности Z02/Z03/Z07/Z10 /Z11/Z15/Z39 (CD28+L+CD137 +L+CD3ζ)	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRSGGGGSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELGGGGSRVKF SRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR

30	Внутриклеточная область аминокислотной последовательности Z34/Z40 (CD137+CD3 ζ +DAP10)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPRLCARPRRSPAQDGK VYINMPGRG
31	Внутриклеточная область аминокислотной последовательности Z35 (CD28+DAP10+CD3 ζ)	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRSLCARPRRSPAQDGK VYINMPGRGRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
32	Внутриклеточная область аминокислотной последовательности Z36 (2B4+DAP10+CD3 ζ)	WRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQT PGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRK RNHSPSFNSTIYE VIGKSQPKAQNPAPLRSRKELENFDVYS LCARPRRSPAQDGK VYINMPGRGRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
33	Внутриклеточная область аминокислотной последовательности Z37/Z41 (CD137+2B4+CD3 ζ)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGG CELWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQE QTFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSG SRKRNHSPSFNSTIYE VIGKSQPKAQNPAPLRSRKELENFD VYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR
34	Внутриклеточная область аминокислотной последовательности Z08/Z16 (CD28+CD3 ζ)	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTATKDTYDA
35	Аминокислотная последовательность Z09/Z01/Z38 CAR (CD4D1D2+CD8h+CD8 α TM+CD137+CD3 ζ)	KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIFHWKNSNQIKILG NQGSFLTGPKSLNDRADSRRLWDQGNFPLIKNLKI SDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTL ESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTL SVSLELQDSGTW TCTVLQNQKKVEFKIDIVVLA AAFVPVFLPAKPTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEM GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

36	Аминокислотная последовательность Z10/Z02/Z39 CAR (CD4D1D2+CD8h+CD8 α TM+CD28+L+CD137+L+CD3 ζ)	KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKS IQFHWKNSNQIKILG NQGSFLT KGPSKLNDRADSRRLWDQGNFPLIKNLKI SDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTL ESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGK TSVSQLELQDSGTW TCTVLQNQKKVEFKIDIVVLA AAFVPVFLPAKPTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCNHRNRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSGGGGSKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEEGGCELG GGGSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR
37	Аминокислотная последовательность Z11/Z03CAR (CD4D1D2+L3+CD28TM+CD28+L+CD137+L+CD3 ζ)	KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKS IQFHWKNSNQIKILG NQGSFLT KGPSKLNDRADSRRLWDQGNFPLIKNLKI SDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTL ESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGK TSVSQLELQDSGTW TCTVLQNQKKVEFKIDIVVLA GGGGSGGGGSGGGG SFP GPSKPFVVLVVVGGVLA CYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRL LHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSGGGG SKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEEG GCELGGGSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
38	Аминокислотная последовательность Z12/Z13/Z04/Z05 CAR (CD4D1-D4+CD4TM+CD137+CD3 ζ)	KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKS IQFHWKNSNQIKILG NQGSFLT KGPSKLNDRADSRRLWDQGNFPLIKNLKI SDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTL ESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGK TSVSQLELQDSGTW TCTVLQNQKKVEFKIDIVVLA FQKASSIVYKKEGEQVEF SFPLAFTVEKLTGSGELWWQAERASSSKSWITFDLKNKE VSVKRVTQDPKLMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGNLT LALAKTGKLGHEVNLVVMRATQLQKNLTCEVWGPTSP KLMLSLKLENKEAKVSKREKAVWVLNPEAGMWQCLLS DSGQVLLSNIKVLPTWSTPVQPMALIVLGGVAGLLFI GLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
39	Аминокислотная последовательность Z14/Z06CAR (Nab-scFv+CD8h+CD8 α TM+CD137+C D3 ζ)	DIQMTQSPSSLSASVGDVTITCQANGYLNWYQRRGK APKLLIYDGSKLERGVPSRFSGRRWGQEYNLTINNLQPE DIATYFCQVYEFVVPGTRLDLKR TVAAPGGGGSGGGGS GGGGSQVQLLQSGAAVTKPGASVRVSC EASGYNIRDYFI HWWRQAPGQGLQWVGWINPKTGQPNNPRQFQGRVSLT RHASWDFDTFSFYMDLKALRSDDTAVYFCARQRSYDW DFDVWGSQTQVTVSSASTKGPA AAFVPVFLPAKPTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCNHRNKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG

		KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
40	Аминокислотная последовательность Z15/Z07CAR (Nab-scFv+CD8h+CD8 α TM+CD28+L+CD137+L+CD3 ζ)	DIQMTQSPSSLSASVGDVTITCQANGYLNWYQRRGK APKLLIYDGSKLARGVPSRFSGRRWGQEYNLTINNLQPE DIATYFCQVYEFVVPGTRLDLKRRTVAAPGGGGSGGGGS GGGGSQVQLLQSGAAVTKPGASVRVSCEASGYNIRDYFI HWWRQAPGQGLQWVGWINPKTGQPNNPRQFQGRVSLT RHASWDFDTFSFYMDLKALRSDDTAVYFCARQRSYDW DFDVWGSQTQVTVSSASTKGPAAAFVPVFLPAKPTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSGGGGSKRGR KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELG GGGSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR
41	Аминокислотная последовательность Z16/Z08CAR (CD4D-1D4+CD28TM+CD28+CD3 ζ)	KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIFHWKNSNQIKILG NQSFLTGKPSKLNDRADSRRLWDQGNFPLIKNLKI SDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTL ESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTW TCTVLQNQKKVEFKIDIVVLA FQKASSIVYKKEGEQVEF SFPLAFTVEKLTGSGELWWQAERASSSKSWITFDLKNKE VSVKRVTQDPKLMGKPLHLTL PQALPQYAGSGNLT LALAKTGKLNHVEVNLVVMRATQLQKNLTCEVWGPTSP KLMLSLKLENKEAKVSKREKAVWVLNPEAGMWQCLLS DSGQVLLSNIKVLPTWSTPVPRKIEVMYPPPYLDNEKS NGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVVLVVGGVLACYS LLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKKGHDGLYQGLSTATK DYDA
42	Аминокислотная последовательность Z17CAR (CD4D1D2+CD8h+CD8 α TM+CD137)	KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIFHWKNSNQIKILG NQSFLTGKPSKLNDRADSRRLWDQGNFPLIKNLKI SDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTL ESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTW TCTVLQNQKKVEFKIDIVVLA AAAFVPVFLPAKPTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

43	Аминокислотная последовательность Z34/Z40 CAR (CD4D1D2+CD8h+CD8 α TM+CD137+CD3 ζ +DAP10)	KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILG NQGSFLTkgpsklndradsrrslwdqgnfplliiknlkied SDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSdthllqgqsltltl ESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLsvsqlelqdsGTW TCTVLQnqkkvefkidivvlAAAFVPVFLPAKPTTTPA PRPPTPAPTiasqplslrpeacrpaaggavhtrGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLslvitlycnhrnkrgrkKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELrvkfsrsAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLdkRRGRDPemG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMqALPPRLCARPRRSP AQDGKvYINMPGRG
44	Аминокислотная последовательность Z35CAR (CD4D1D2+CD8h+CD8 α TM+CD28+DAP10+CD3 ζ)	KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILG NQGSFLTkgpsklndradsrrslwdqgnfplliiknlkied SDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSdthllqgqsltltl ESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLsvsqlelqdsGTW TCTVLQnqkkvefkidivvlAAAFVPVFLPAKPTTTPA PRPPTPAPTiasqplslrpeacrpaaggavhtrGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLslvitlycnhrnrskrsrllHSDY MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSLCARPRRSPA QDGKvYINMPGRGRVKfsrsADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLdkRRGRDPemGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK TYDALHMqALPPR
45	Аминокислотная последовательность Z36CAR (CD4D1D2+CD8h+CD8 α TM+2B4+DAP10+CD3 ζ)	KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILG NQGSFLTkgpsklndradsrrslwdqgnfplliiknlkied SDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSdthllqgqsltltl ESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLsvsqlelqdsGTW TCTVLQnqkkvefkidivvlAAAFVPVFLPAKPTTTPA PRPPTPAPTiasqplslrpeacrpaaggavhtrGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLslvitlycnhrnwrrkrkeKQSET SPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTfPGGGSTIYSMIQS QSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYE VIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSLCARPRRSPAQD GKvYINMPGRGRVKfsrsADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLdkRRGRDPemGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMqALPPR
46	Аминокислотная последовательность Z37/Z41 CAR (CD4D1D2+CD8h+CD8 α TM+CD137+2B4+CD3 ζ)	KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILG NQGSFLTkgpsklndradsrrslwdqgnfplliiknlkied SDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSdthllqgqsltltl ESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLsvsqlelqdsGTW TCTVLQnqkkvefkidivvlAAAFVPVFLPAKPTTTPA PRPPTPAPTiasqplslrpeacrpaaggavhtrGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLslvitlycnhrnkrgrkKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELWRRKRKEK QSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTfPGGGSTIYS MIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNS TIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSRVKfsrsa DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLdkRRGRDPem GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMqALPPR

47	Аминокислотная последовательность P2A	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
48	Аминокислотная последовательность RFP	ASSEDVIKEFMRFKVRMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEG TQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFQYGSKAYVKHPADI PDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGE FIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASTERMYPED GALKGEIKMRLKLDGGHYDAEVKTTYMAKKPVQLPG AYKTDIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGA
49	Аминокислотная последовательность tEGFR	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SIN ATNIKHFKNCT SISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELD ILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYAN TINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSP EGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFV ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGP HCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCT YGCTGPGLEGCP TNGPKIPS IATGMV GALLLLLVVALGIG LFM
50	Аминокислотная последовательность (без сигнального пептида) tEGFR	RKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCT SISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRG RECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITC TGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPS I TGMV GALLLLLVVALGIGLFM

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная клетка, включающая следующую функциональную структуру:

1) химерный антигенный рецептор (CAR) или кодирующая его нуклеиновая кислота, в котором CAR включает внеклеточную область, трансмембранную область и внутриклеточную область, в которой внеклеточная область может специфически связываться с белком gp120 ВИЧ; и

2) по меньшей мере, одна кшРНК или кодирующая ее нуклеиновая кислота, в которой кшРНК нацелена на один или несколько генов хозяина или генов ВИЧ, участвующих в жизненном цикле ВИЧ, выбранных из группы, состоящей из NF-κB, CCR5, TSG101, CXCR4, P-TEFb, tat, rev, nef, env, LTR и gag.

2. Рекомбинантная клетка по п. 1, в которой кшРНК включает:

(i) кшРНК, нацеленную на gag, и кшРНК, нацеленную на LTR, или

(ii) кшРНК, нацеленную на gag, и кшРНК, нацеленную на nef.

3. Рекомбинантная клетка по п. 1 или 2, в которой последовательность кшРНК, нацеленная на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 1 или 5 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 1 или 5; последовательность кшРНК, нацеленная на LTR, включает последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 2; кшРНК, нацеленная на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 6 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 6.

4. Рекомбинантная клетка по п. 3, в которой кшРНК включает:

(i) кшРНК, нацеленную на gag, и кшРНК, нацеленную на LTR, в которой кшРНК, нацеленная на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 1 и кшРНК, нацеленная на LTR, включает последовательность SEQ ID NO: 2.

(ii) кшРНК, нацеленную на gag, и кшРНК, нацеленную на nef, в которой кшРНК, нацеленная на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 5 и кшРНК, нацеленная на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 6.

5. Рекомбинантная клетка по п. 1, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, включает:

(i) нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на gag, и нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на LTR, или

(ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на gag, и нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на nef.

6. Рекомбинантная клетка по п. 1 или 5, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 3 или 7 или включает последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 3 или 7; нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на LTR, включает последовательность SEQ ID NO: 4 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 4; нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 8 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 8.

7. Рекомбинантная клетка по п. 6, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, включает:

(i) нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на gag, и нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на LTR, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 3 и нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на LTR, включает последовательность SEQ ID NO: 4, или

(ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на gag, и нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на nef, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 7 и нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 8.

8. Рекомбинантная клетка по любому из пп. 1-7, в которой CAR дополнительно включает шарнирную область, и внеклеточная область соединена с трансмембранной областью шарнирной областью.

9. Рекомбинантная клетка по п. 8, в которой шарнирную область получают из шарнирной области или она включает шарнирную область человеческого Ig, линкер GS, шарнир KIR2DS2 или шарнирную область CD8 α .

10. Рекомбинантная клетка по п. 9, в которой шарнирная область включает последовательность SEQ ID NO: 20 или включает последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 20.

11. Рекомбинантная клетка по любому из пп. 1-10, в которой внеклеточная область включает внеклеточную область молекулы человеческого CD4, предпочтительно, домен D1-D4 молекулы CD4 и, наиболее предпочтительно, домены D1 и D2 молекулы CD4.

12. Рекомбинантная клетка по п. 11, в которой внеклеточная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или аминокислотную

последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

13. Рекомбинантная клетка по любому из пп. 1-12, в которой трансмембранную область получают из трансмембранного домена или она включает трансмембранный домен одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы, состоящей из α -, β - или ζ -цепи рецептора Т-клеток, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D4, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D и NKG2C.

14. Рекомбинантная клетка по п. 13, в которой трансмембранную область получают из трансмембранного домена или она включает трансмембранный домен молекулы белка CD8 α .

15. Рекомбинантная клетка по п. 14, в которой трансмембранная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18.

16. Рекомбинантная клетка по любому из пп. 1-15, в которой внутриклеточная область включает первичный домен сигнальной трансдукции и костимулирующий домен, и первичный домен сигнальной трансдукции получают из домена сигнальной трансдукции или он включает домен сигнальной трансдукции одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы, состоящей из CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , FCER1G, Fc ϵ R1b, CD79a, CD79b, Fc γ RIIa, DAP10 и DAP12 и костимулирующий домен получают из домена сигнальной трансдукции или он включает домен сигнальной трансдукции одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов, специфически связывающихся с CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80, CD160, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2,

TRANCE/RANKL, DNAM1, SLAMF4, CD84, CD96, CEACAM1, CRTAM, Ly9, CD160, PSGL1, CD100, CD69, SLAMF6, SLAM, BLAME, SELPLG, LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D и DAP10.

17. Рекомбинантная клетка по п. 16, в которой первичный домен сигнальной трансдукции получают из домена сигнальной трансдукции или он включает домен сигнальной трансдукции CD3 ζ , и костимулирующий домен получают из одного из доменов сигнальной трансдукции или он включает один из доменов сигнальной трансдукции из CD137, CD28, 2B4 или DAP10 или их комбинации.

18. Рекомбинантная клетка по любому из пп. 1-15, в которой внутриклеточная область включает:

- (i) домены сигнальной трансдукции из CD137 и CD3 ζ ;
- (ii) домены сигнальной трансдукции из CD28, CD137 и CD3 ζ ;
- (iii) домены сигнальной трансдукции из CD137, CD3 ζ и DAP10;
- (iv) домены сигнальной трансдукции из CD28, DAP10 и CD3 ζ ;
- (v) домены сигнальной трансдукции из 2B4, DAP10 и CD3 ζ ; или
- (vi) домены сигнальной трансдукции из CD137, 2B4 и CD3 ζ .

19. Рекомбинантная клетка по любому из пп. 16-18, в которой линкерный пептид также включают во внутриклеточную область между первичным доменом сигнальной трансдукции и костимулирующим доменом и, предпочтительно, линкерный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

20. Рекомбинантная клетка по любому из пп. 1-19, в которой внутриклеточная область включает любую аминокислотную последовательность из последовательностей SEQ ID NO: 28-34 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности любой из последовательностей SEQ ID NO: 28-34.

21. Рекомбинантная клетка по любому из пп. 1-20, в которой CAR включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 35-46 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности любой из последовательностей SEQ ID NO: 35-46.

22. Рекомбинантная клетка по любому из пп. 1-21, в которой дополнительный сигнальный пептид связан с CAR и сигнальный пептид получают из сигнального пептида или он включает сигнальный пептид любых секреторных белков или мембранных белков.

23. Рекомбинантная клетка по п. 22, в которой сигнальный пептид получают из сигнального пептида или он включает сигнальный пептид из CD4 или CD8 и предпочтительно, сигнальный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 17.

24. Рекомбинантная клетка по любому из пп. 1-23, в которой рекомбинантная клетка дополнительно включает репортерную молекулу и/или защитный выключатель.

25. Рекомбинантная клетка по п. 24, в которой защитный выключатель выбирают из одного или нескольких следующих вариантов: iCaspase-9, iCaspase-1, iCaspase-8, HSV-TK, VZV-TK, цитозиндезаминаза (CD), CD20, tEGFR, FR806 и RQP8.

26. Рекомбинантная клетка по п. 25, в которой аминокислотная последовательность tEGFR показана в последовательности SEQ ID NO: 49 или 50.

27. Рекомбинантная клетка по любому из пп. 1-26, в которой рекомбинантную клетку получают из ВИЧ рецепторной клетки, моноклеарных клеток периферической крови или лимфоцитов; предпочтительно, рекомбинантную клетку получают из Т-клеток (например, наивных Т-клеток, Т-клеток памяти, эффекторных Т-клеток, цитотоксических Т-клеток, хелперных Т-клеток, регуляторных Т-клеток, Т-клеток CD4+, Т-клеток CD8+, НКТ-клеток, $\gamma\delta$ -клеток и т.д.), НК-клеток, антигенпрезентирующих клеток (например, макрофагов, дендритных клеток и т.д.); или рекомбинантную клетку получают из клетки-предшественника или стволовой клетки, включая, помимо прочего, гемопоэтическую стволовую клетку, гемопоэтическую клетку-предшественника, стволовую Т-клетку памяти (например, центральную Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или подобную стволовой клетке Т-клетку памяти).

28. Рекомбинантная клетка по п. 27, в которой рекомбинантную клетку получают от человека или примата; предпочтительно, клетку получают от пациентов, инфицированных ВИЧ, или от здоровой популяции.

29. Вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий CAR, кшРНК, репортерную молекулу и/или защитный выключатель рекомбинантной клетки по любому из пп. 1-28.

30. Вектор по п. 29, выбранный из группы, состоящей из плазмид, вирусных векторов или линейных молекул нуклеиновых кислот.

31. Вектор по пп. 29 или 30, в котором экспрессией химерного антигенного рецептора (CAR) и кшРНК управляет один промотор или разные промоторы, а экспрессией, по меньшей мере, одной кшРНК управляет один промотор или разные промоторы.

32. Химерный антигенный рецептор (CAR), включающий внеклеточную область, трансмембранную область и внутриклеточную область, в котором внеклеточную область получают из внеклеточной области или она включает внеклеточную область человеческой молекулы CD4, а трансмембранную область получают из трансмембранного домена CD8 α или она включает его.

33. Химерный антигенный рецептор по п. 32, в котором химерный антигенный

рецептор дополнительно включает шарнирную область и внеклеточная область соединена с трансмембранной областью шарнирной областью.

34. Химерный антигенный рецептор по п. 33, в которой шарнирную область получают из шарнирной области или она включает шарнирную область человеческого Ig, линкер GS, шарнир KIR2DS2 или шарнирную область CD8 α , предпочтительно, шарнирную область CD8 α .

35. Химерный антигенный рецептор по п. 34, в котором шарнирная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 20.

36. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 32-35, в котором внеклеточная область состоит из доменов D1 и D2 молекулы CD4.

37. Химерный антигенный рецептор по п. 36, в котором внеклеточная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

38. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 32-37, в котором трансмембранная область включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

39. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 32-38, в котором внутриклеточная область включает первичный домен сигнальной трансдукции и костимулирующий домен, и первичный домен сигнальной трансдукции получают из домена сигнальной трансдукции или он включает домен сигнальной трансдукции одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы, состоящей из CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , FCER1G, Fc ϵ R1b, CD79a, CD79b, Fc γ RIIa, DAP10 и DAP12, и костимулирующий домен получают из домена сигнальной трансдукции или он включает домен сигнальной трансдукции одной или нескольких молекул белка, выбранных из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов, специфически связывающихся с CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80, CD160, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1, SLAMF4, CD84, CD96, CEACAM1, CRTAM, Ly9, CD160, PSGL1, CD100, CD69, SLAMF6, SLAM, BLAME, SELPLG, LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D и DAP10.

40. Химерный антигенный рецептор по п. 39, в котором первичный домен сигнальной трансдукции получают из домена сигнальной трансдукции или он включает домен сигнальной трансдукции CD3 ζ или DAP10, и костимулирующий домен получают из

одного из доменов сигнальной трансдукции или он включает один из доменов сигнальной трансдукции из CD137, CD28, 2B4 или DAP10 или их комбинации.

41. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 32-40, в котором внутриклеточная область включает:

- (i) домены сигнальной трансдукции из CD137 и CD3 ζ ;
- (ii) домены сигнальной трансдукции из CD28, CD137 и CD3 ζ ;
- (iii) домены сигнальной трансдукции из CD137, CD3 ζ и DAP10;
- (iv) домены сигнальной трансдукции из CD28, DAP10 и CD3 ζ ;
- (v) домены сигнальной трансдукции из 2B4, DAP10 и CD3 ζ ; or
- (vi) домены сигнальной трансдукции из CD137, 2B4 и CD3 ζ .

42. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 39-41, в которой линкерный пептид также включен во внутриклеточную область между первичным доменом сигнальной трансдукции и костимулирующим доменом или между каждым костимулирующим доменом.

43. Химерный антигенный рецептор по п. 42, в котором последовательность линкерного пептида включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

44. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 32-43, в котором последовательность внутриклеточной области включает аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 28-34 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности любой из последовательностей SEQ ID NO: 28-34.

45. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 32-44, в котором дополнительный сигнальный пептид связан с химерным антигенным рецептором и сигнальный пептид получают из сигнального пептида или он включает сигнальный пептид из любых секреторных белков или мембранных белков.

46. Химерный антигенный рецептор по п. 45, в котором сигнальный пептид получают из сигнального пептида или он включает сигнальный пептид из молекулы CD4 или CD8 и, предпочтительно, сигнальный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 17.

47. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 32-46, в которой химерный антигенный рецептор включает любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 35, 36 и 43-46, или включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности любой из последовательностей SEQ ID NO: 35, 36 и 43-46.

48. Полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор по любому из пп.

32-47.

49. Вектор, включающий полинуклеотид по п.1 48.

50. Вектор по п.49, выбранный из группы, состоящей из плазмид, вирусных векторов или линейных молекул нуклеиновых кислот.

51. Рекомбинантная клетка, включающая химерный антигенный рецептор по любому из пп. 32-47 или полинуклеотид по п. 48 или вектор по пп. 49 или 50.

52. Рекомбинантная клетка по п. 51, в которой рекомбинантную клетку получают от человека или примата; более предпочтительно, рекомбинантная клетка получают от пациентов, инфицированных ВИЧ, или получают от здорового населения; более предпочтительно, рекомбинантную клетку получают из ВИЧ рецепторной клетки, моноклеарной клетки периферической крови или лимфоцита; более предпочтительно, рекомбинантную клетку получают из Т-клеток (например, наивных Т-клеток, Т-клеток памяти, эффекторных Т-клеток, цитотоксических Т-клеток, хелперных Т-клеток, регуляторных Т-клеток, Т-клеток CD4+, Т-клеток CD8+, НКТ-клеток, $\gamma\delta$ -клеток и т.д.), НК-клеток, антигенпрезентирующих клеток (например, макрофагов, дендритных клеток и т. д.); или рекомбинантную клетку получают из клетки-предшественника или стволовой клетки, включая без ограничений, гемопоэтической стволовой клеткой, гемопоэтической клеткой-предшественником, стволовой Т-клеткой памяти (например, центральной Т-клеткой памяти, эффекторной Т-клеткой памяти или стволовой Т-клеткой памяти).

53. Комбинация химерного антигенного рецептора по пп. 32-47 или полинуклеотида по п. 48, вектора по п. 49 или 50 или рекомбинантной клетки по п. 51 или 52 и, по меньшей мере, одной кшРНК, нацеленной на HIV, или кодирующей ее нуклеиновой кислоты, или вектора, включающего ее нуклеиновую кислоту.

54. Комбинация по п. 53, в которой, по меньшей мере, одна кшРНК нацелена на любой один или несколько генов хозяина или на гены ВИЧ, участвующие в жизненном цикле ВИЧ, выбранные из группы, состоящей из NF- κ B, CCR5, TSG101, CXCR4, P-TEFb, tat, rev, nef, env, LTR и gag.

55. Комбинация по п. 54, в которой комбинация включает:

- (i) кшРНК, нацеленную на gag, и кшРНК, нацеленную на LTR, или
- (ii) кшРНК, нацеленную на gag, и кшРНК, нацеленную на nef.

56. Комбинация по п. 54 или 55, в которой кшРНК, нацеленная на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 1 или 5 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 1 или 5, кшРНК, нацеленная на LTR включает последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 2 и кшРНК,

нацеленная на nef включает последовательность SEQ ID NO: 6 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 6.

57. Комбинация по п. 56, в которой комбинация включает:

(i) кшРНК, нацеленную на gag, и кшРНК, нацеленную на LTR, в которой кшРНК, нацеленная на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 1 и кшРНК, нацеленная на LTR, включает последовательность SEQ ID NO: 2.

(ii) кшРНК, нацеленную на gag, и кшРНК, нацеленную на nef, в которой кшРНК, нацеленная на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 5 и кшРНК, нацеленная на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 6.

58. Комбинация по п. 54, в которой комбинация включает:

(i) нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на gag, и нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на LTR, или вектор, включающий указанную выше нуклеиновую кислоту, или

(ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на gag, и нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на LTR, или вектор, включающий указанную выше нуклеиновую кислоту.

59. Комбинация по п. 54 или 58, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 3 или 7 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 3 или 7, и нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на LTR, включает последовательность SEQ ID NO: 4 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 4, и нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 8 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 8.

60. Комбинация по п. 59, в которой комбинация включает:

(i) нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на gag, и нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на LTR, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 3, и нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на LTR, включает последовательность SEQ ID NO: 4, или вектор, включающий указанную выше нуклеиновую кислоту, или

(ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на gag, и нуклеиновую кислоту, кодирующую кшРНК, нацеленную на nef, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на gag, включает последовательность SEQ ID NO: 7, и

нуклеиновая кислота, кодирующая кшРНК, нацеленную на nef, включает последовательность SEQ ID NO: 8, или вектор, включающий указанную выше нуклеиновую кислоту.

61. Фармацевтическая композиция, включающая комбинацию рекомбинантной клетки по любому из пп. 1-28, вектора по любому из пп. 29-31, химерного антигенного рецептора по любому из пп. 32-47, полинуклеотида по п. 48, вектора по п. 49 или 50, рекомбинантной клетки по п. 51 или 52, или комбинацию рекомбинантной клетки по любому из пп. 53-60 и, по меньшей мере, одну кшРНК или кодирующую ее нуклеиновую кислоту или вектор, включающий указанную выше нуклеиновую кислоту и фармацевтически приемлемый носитель.

62. Фармацевтическая композиция по п. 61, для применения при лечении ВИЧ-инфекции или СПИД.

63. Фармацевтическая композиция по п. 61 или 62, в которой фармацевтическая композиция дополнительно включает другие препараты против ВИЧ, включая, без ограничений, нуклеозидные ингибиторы, вакцины против ВИЧ, нейтрализующие антитела широкого спектра действия и/или CAR-T-клетки.

64. Применение комбинации рекомбинантной клетки по любому из пп. 1-28, вектора по любому из пп. 29-31, химерного антигенный рецептора по любому из пп. 32-47 или полинуклеотида по п. 48, вектора по п. 49 или 50, рекомбинантной клетки по п. 51 или 52 или по любому из пп. 53-60 при изготовлении лекарственного средства для лечения и/или профилактики ВИЧ-инфекции или СПИД.

65. Способ лечения ВИЧ-инфекции или СПИД, включающий введение субъекту, инфицированному ВИЧ или страдающему СПИД, комбинации рекомбинантной клетки по любому из пп. 1-28, вектора по любому из пп. 29-31, химерного антигенного рецептора по любому из пп. 32-47, полинуклеотида по п. 48, вектора по п. 49 или 50, рекомбинантной клетки по п. 51 или 52 или рекомбинантной клетки по любому из пп. 53-60 и, по меньшей мере, одной кшРНК или кодирующей ее нуклеиновой кислоты или вектора, включающего ее нуклеиновую кислоту, или фармацевтической композиции по любому из пп. 61-63.

66. Способ лечения по п. 65, в которой при введении комбинации рекомбинантной клетки по любому из пп. 53-60 и, по меньшей мере, одной кшРНК или кодирующей ее нуклеиновой кислоты или вектора, включающего ее нуклеиновую кислоту, рекомбинантную клетку и, по меньшей мере, одну кшРНК или кодирующую ее нуклеиновую кислоту или вектор, включающий ее нуклеиновую кислоту, можно вводить последовательно или одновременно.

67. Способ лечения по п. 65 или 66, дополнительно включающий введение субъекту

других препаратов против ВИЧ, включая, помимо прочего, другие нуклеозидные ингибиторы, вакцины против ВИЧ, нейтрализующие антитела широкого спектра действия и/или CAR-T-клетки.

	shRNA	Сигнальный пептид	Внеклеточная область	Шарнирная область	Трансмембранная область	Внутриклеточная область			P2A-репортер
Z09	G3L2	Сигнал CD4	CD4 D1D2	CD8h	CD8a TM	CD137	CD3ζ		P2A-репортер
Z10	G3L2	Сигнал CD4	CD4 D1D2	CD8h	CD8a TM	CD28	CD137	CD3ζ	P2A-репортер
Z11	G3L2	Сигнал CD4	CD4 D1D2	L3	CD28 TM	CD28	CD137	CD3ζ	P2A-репортер
Z12	G3L2	Сигнал CD4	CD4 D1-D4		CD4 TM	CD137	CD3ζ		P2A-репортер
Z13	G3L2	Сигнал CD8	CD4 D1-D4		CD4 TM	CD137	CD3ζ		P2A-репортер
Z14	G3L2	Сигнал CD8	Nab-scFv	CD8h	CD8a TM	CD137	CD3ζ		P2A-репортер
Z15	G3L2	Сигнал CD8	Nab-scFv	CD8h	CD8a TM	CD28	CD137	CD3ζ	P2A-репортер
Z17	G3L2	Сигнал CD4	CD4 D1D2	CD8h	CD8a TM	CD137			P2A-репортер
Z34	G3L2	Сигнал CD4	CD4 D1D2	CD8h	CD8a TM	CD137	CD3ζ	DAP10	P2A-репортер
Z35	G3L2	Сигнал CD4	CD4 D1D2	CD8h	CD8a TM	CD28	DAP10	CD3ζ	P2A-репортер
Z36	G3L2	Сигнал CD4	CD4 D1D2	CD8h	CD8a TM	2B4	DAP10	CD3ζ	P2A-репортер
Z37	G3L2	Сигнал CD4	CD4 D1D2	CD8h	CD8a TM	CD137	2B4	CD3ζ	P2A-репортер
Z38	G2N	Сигнал CD4	CD4 D1D2	CD8h	CD8a TM	CD137	CD3ζ		P2A-репортер
Z39	G2N	Сигнал CD4	CD4 D1D2	CD8h	CD8a TM	CD28	CD137	CD3ζ	P2A-репортер
Z40	G2N	Сигнал CD4	CD4 D1D2	CD8h	CD8a TM	CD137	CD3ζ	DAP10	P2A-репортер
Z41	G2N	Сигнал CD4	CD4 D1D2	CD8h	CD8a TM	CD137	2B4	CD3ζ	P2A-репортер

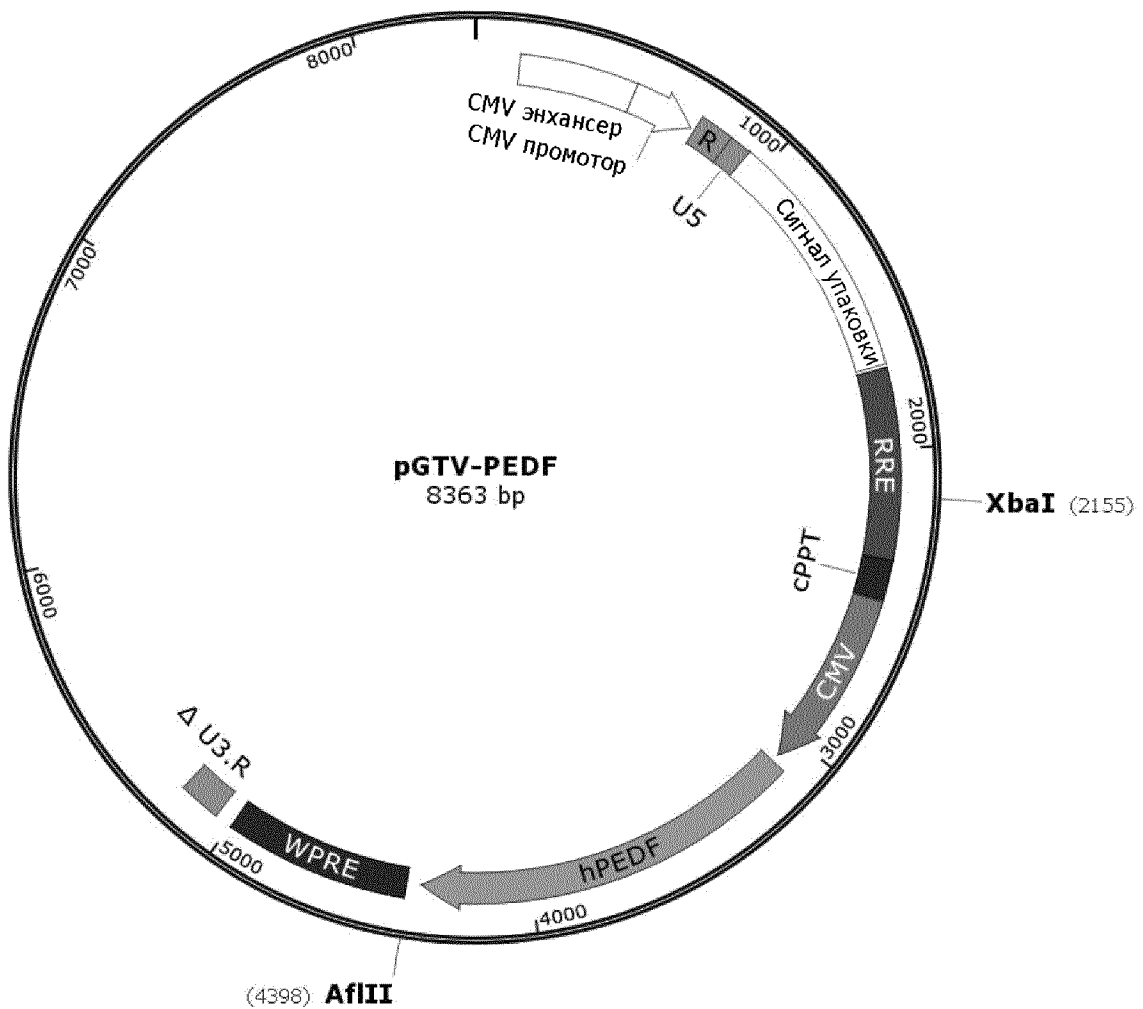
ФИГ. 1А

	Сигнальный пептид	Внеклеточная область	Шарнирная область	Трансмембранная область	Внутриклеточная область			P2A-репортер
Z01	Сигнал CD4	CD4 D1D2	CD8h	CD8a TM	CD137	CD3ζ		P2A-репортер
Z02	Сигнал CD4	CD4 D1D2	CD8h	CD8a TM	CD28	CD137	CD3ζ	P2A-репортер
Z03	Сигнал CD4	CD4 D1D2	L3	CD28 TM	CD28	CD137	CD3ζ	P2A-репортер
Z04	Сигнал CD4	CD4 D1-D4		CD4 TM	CD137	CD3ζ		P2A-репортер
Z05	Сигнал CD8	CD4 D1-D4		CD4 TM	CD137	CD3ζ		P2A-репортер
Z06	Сигнал CD8	Nab-scFv	CD8h	CD8a TM	CD137	CD3ζ		P2A-репортер
Z07	Сигнал CD8	Nab-scFv	CD8h	CD8a TM	CD28	CD137	CD3ζ	P2A-репортер

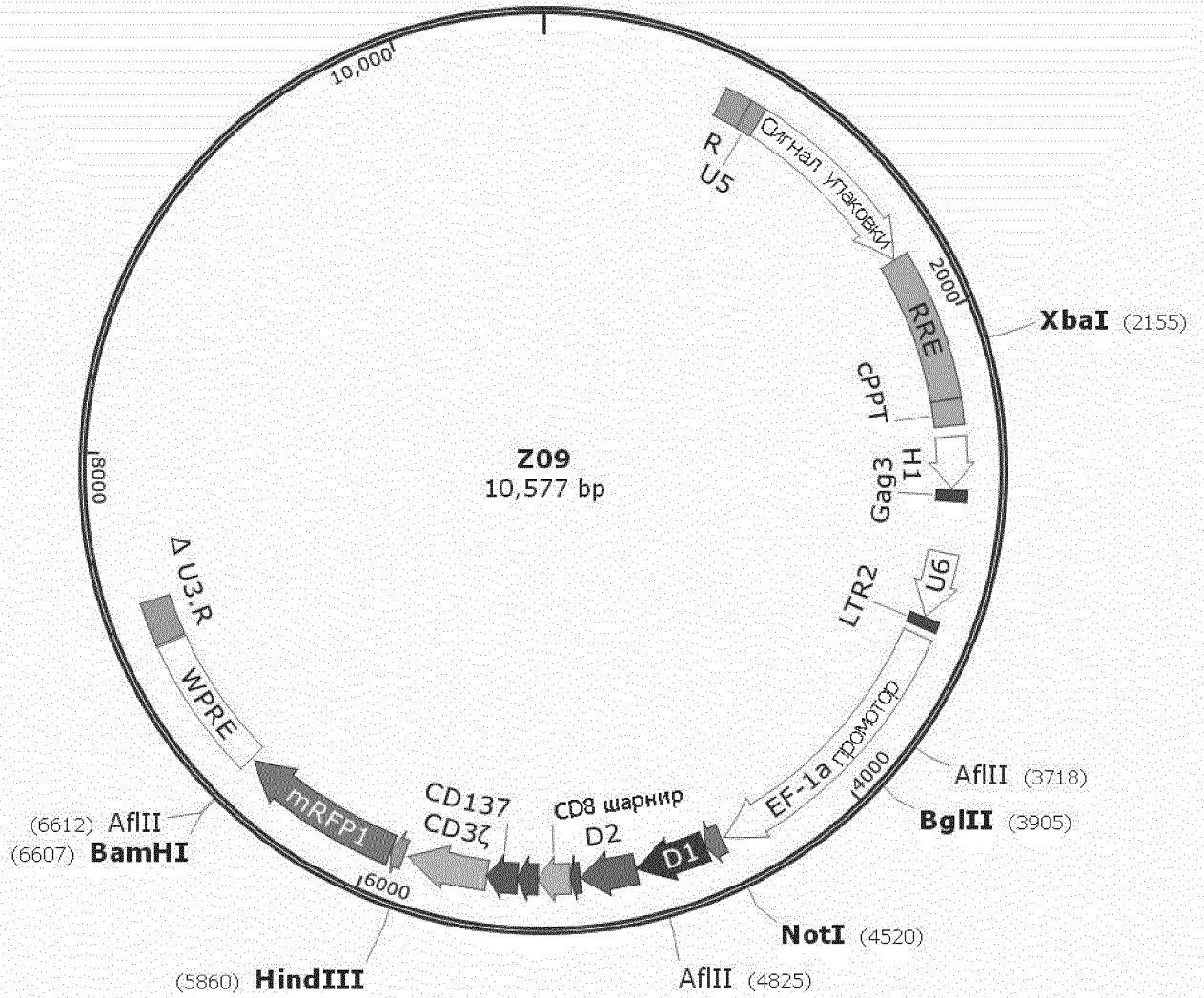
ФИГ. 1В



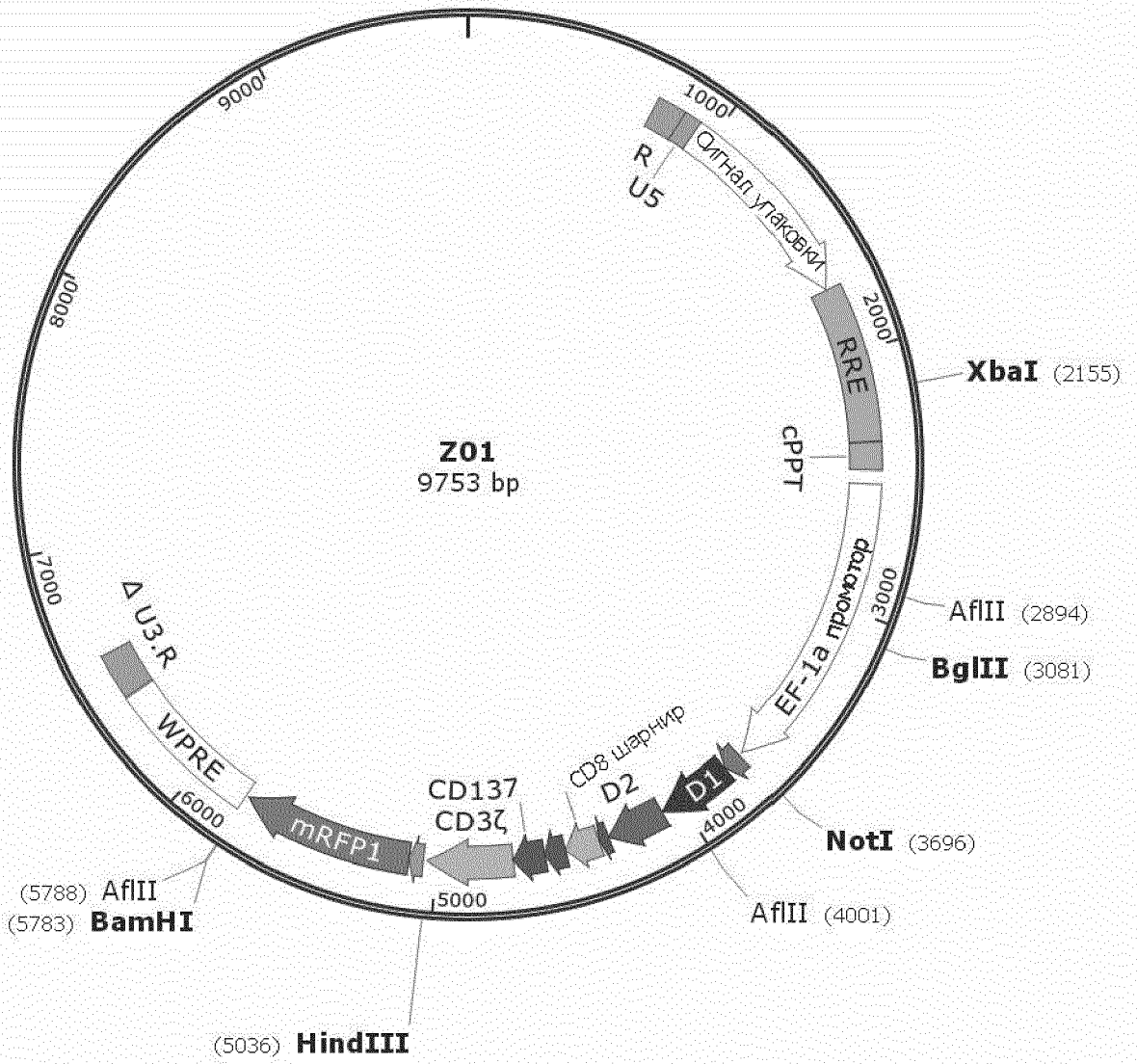
Фиг. 1С



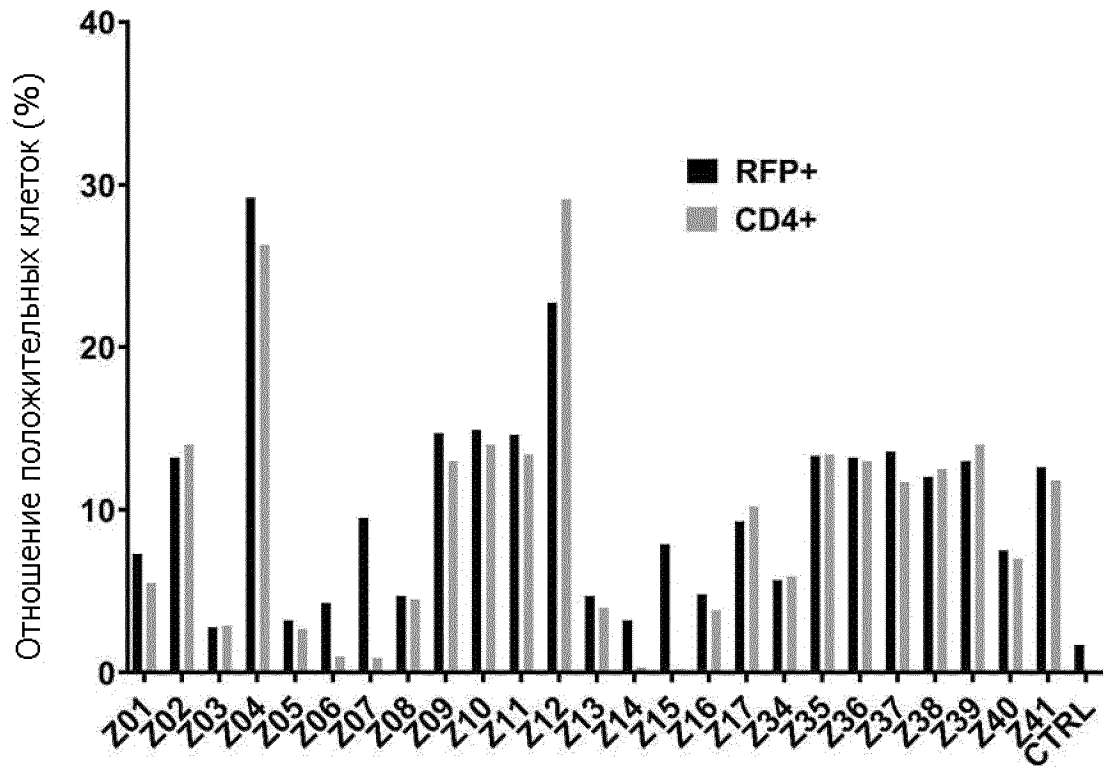
Фиг. 2А



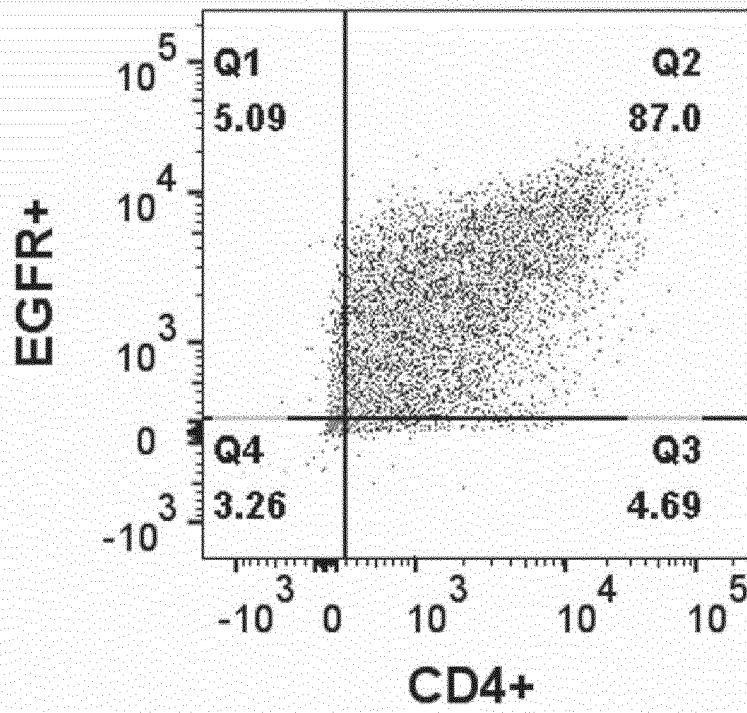
Фиг. 2В



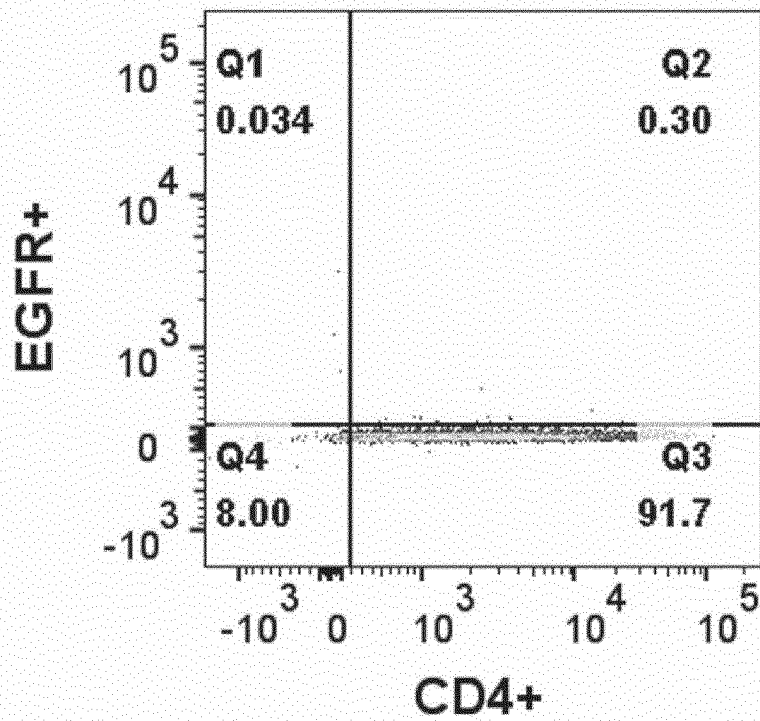
Фиг. 2С



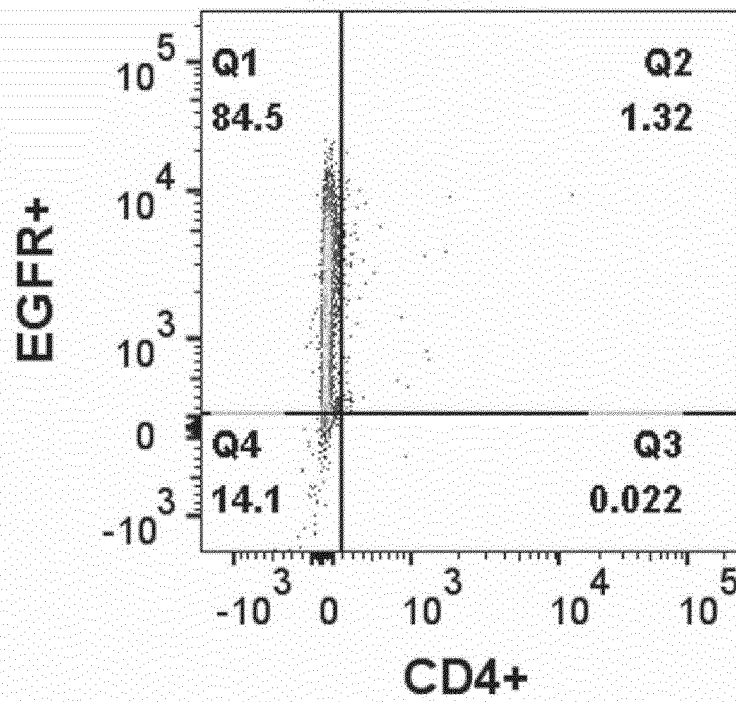
ФИГ. 3



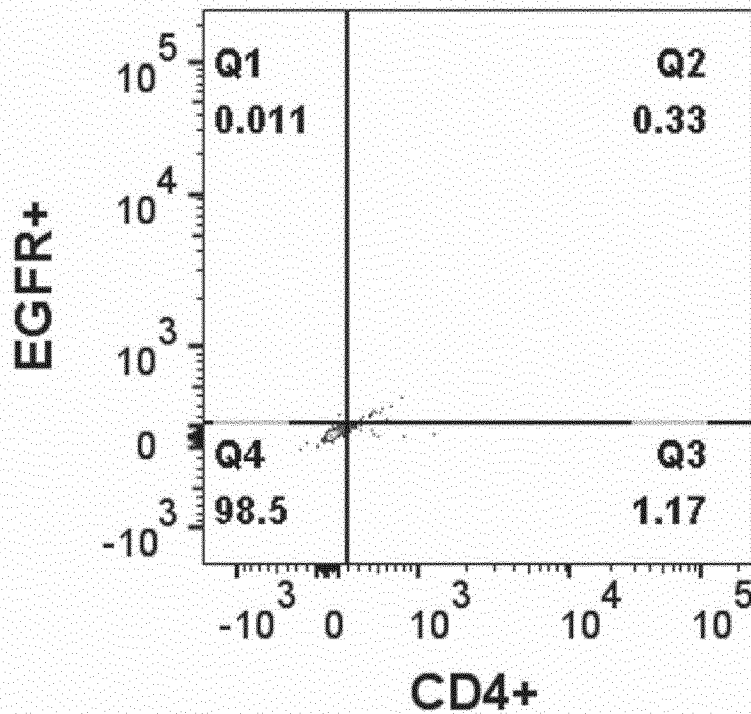
ФИГ. 4А



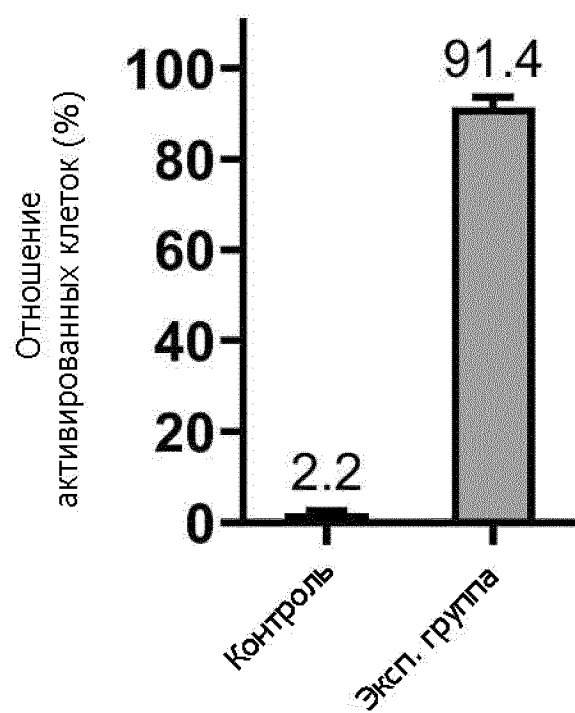
ФИГ. 4В



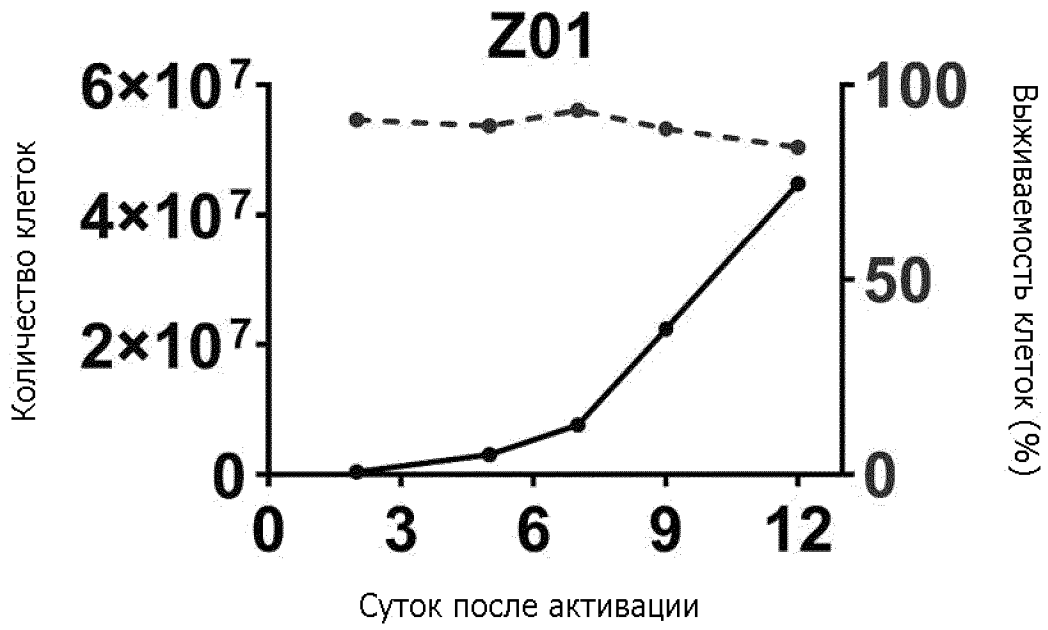
Фиг. 4С



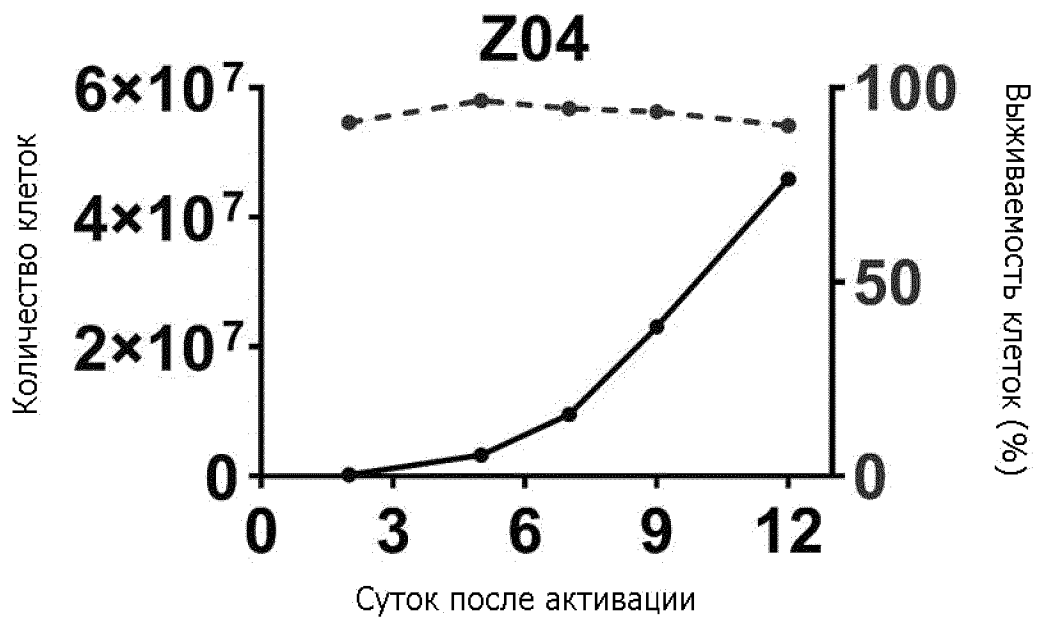
Фиг. 4D



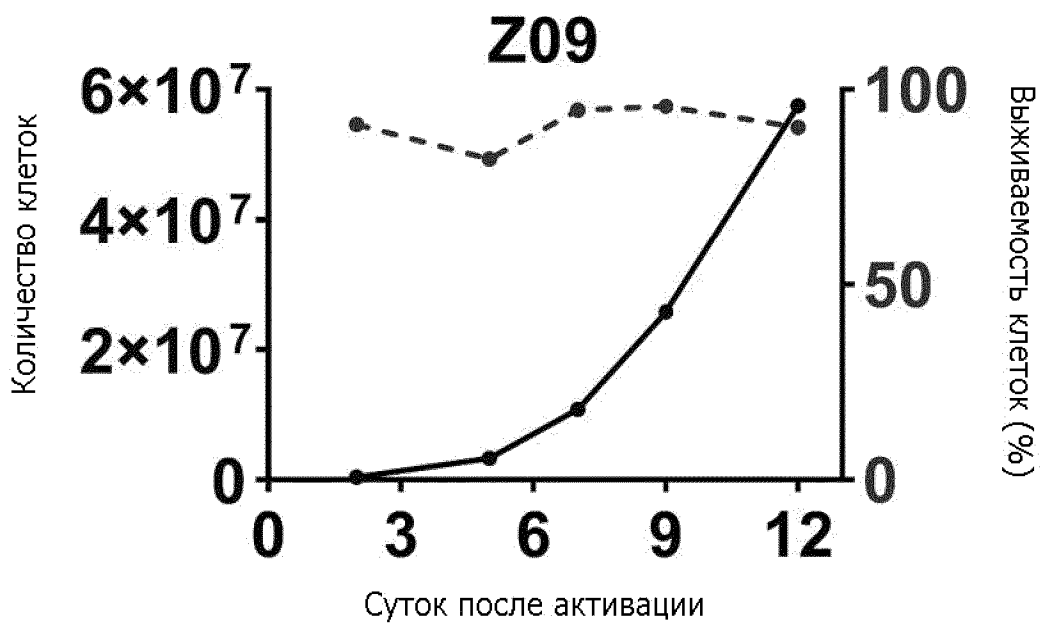
ФИГ. 5



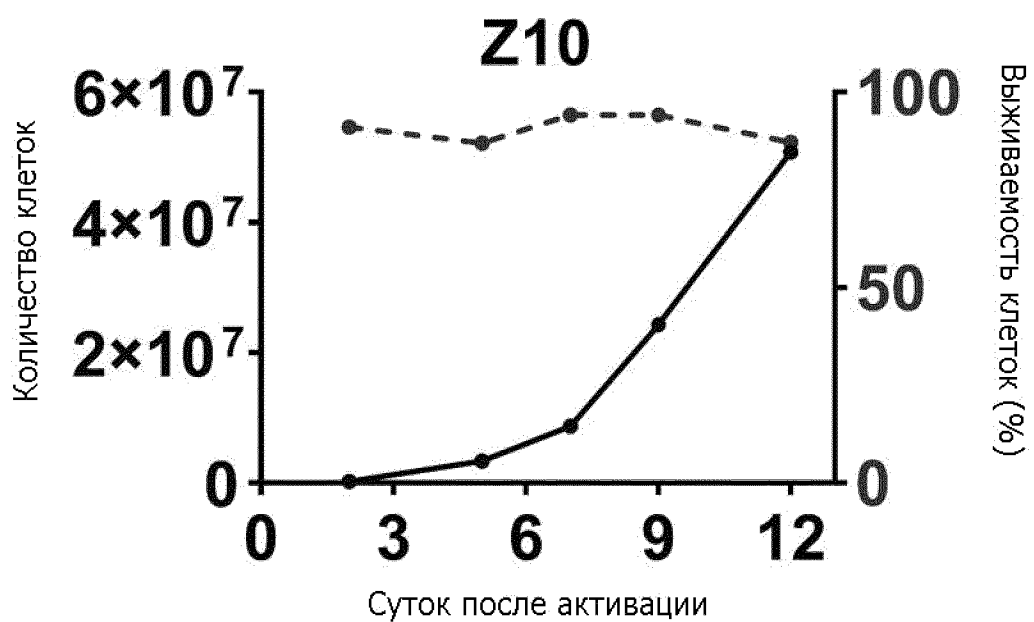
Фиг. 6А



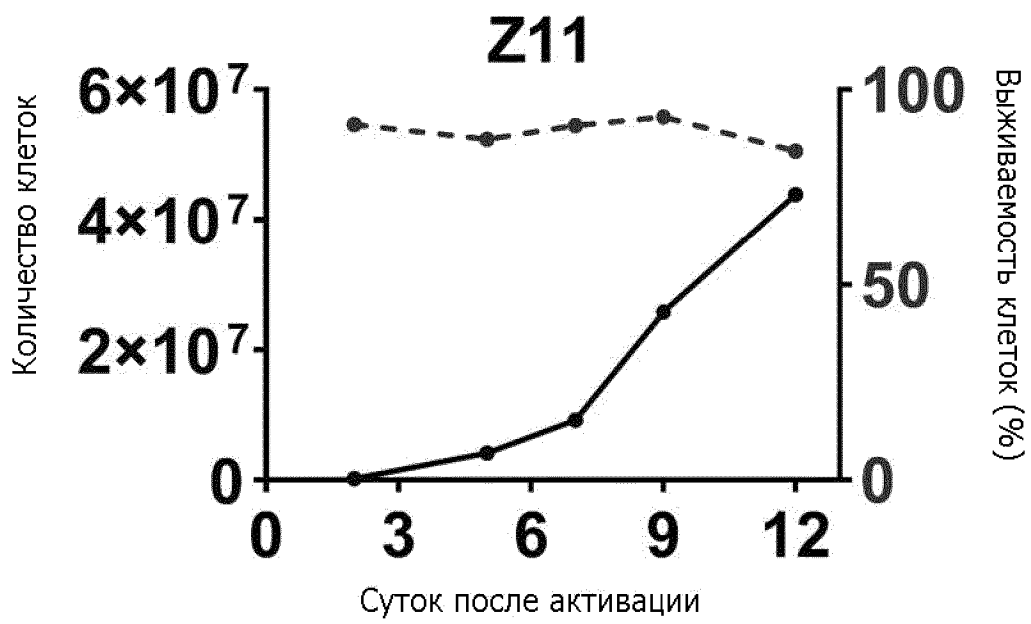
Фиг. 6В



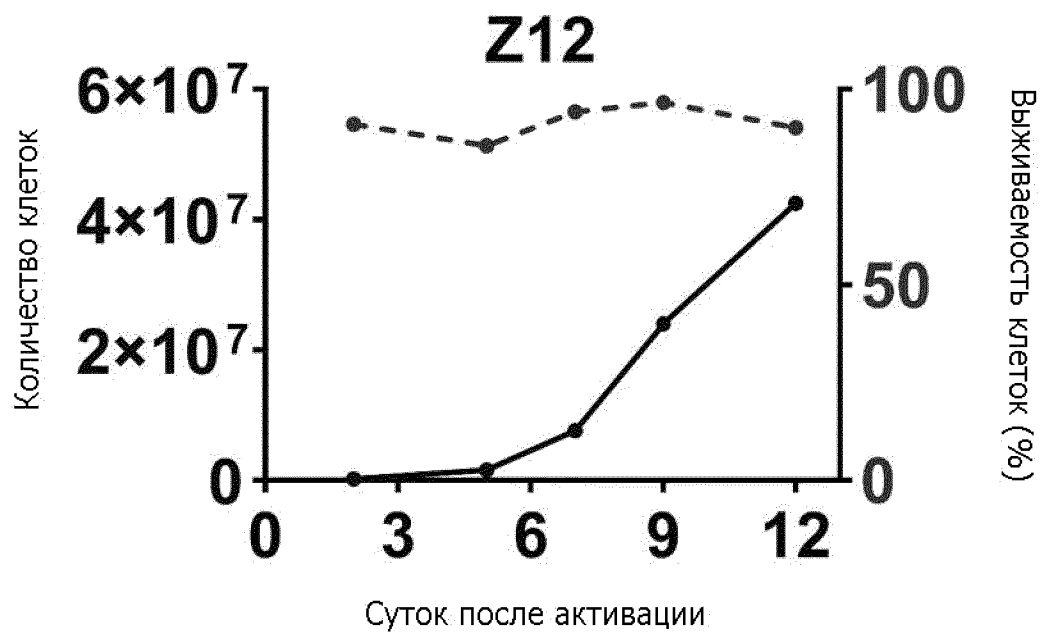
Фиг. 6С



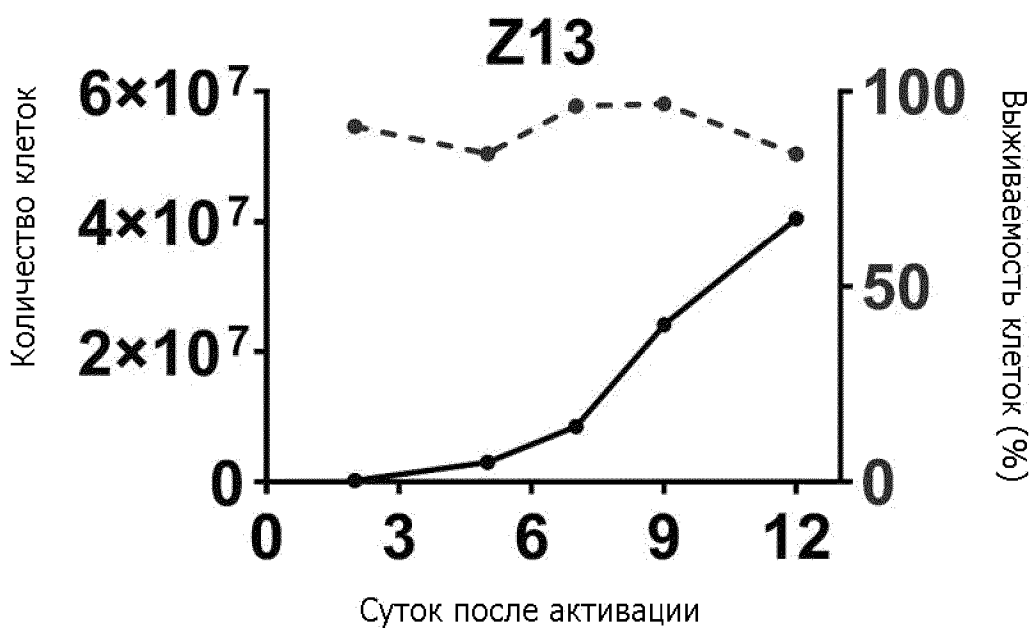
Фиг. 6D



Фиг. 6Е



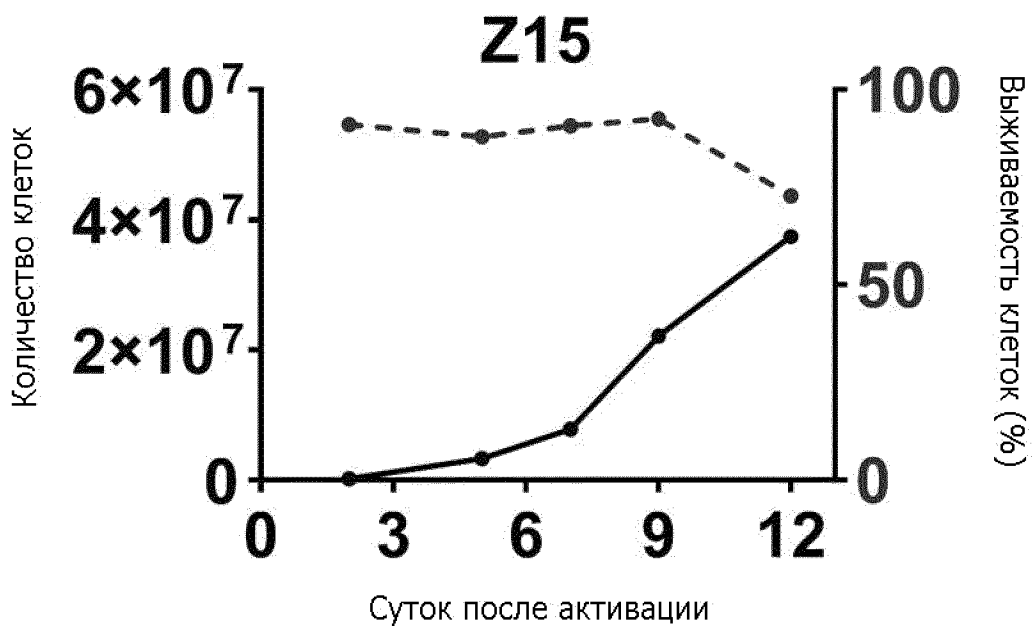
Фиг. 6F



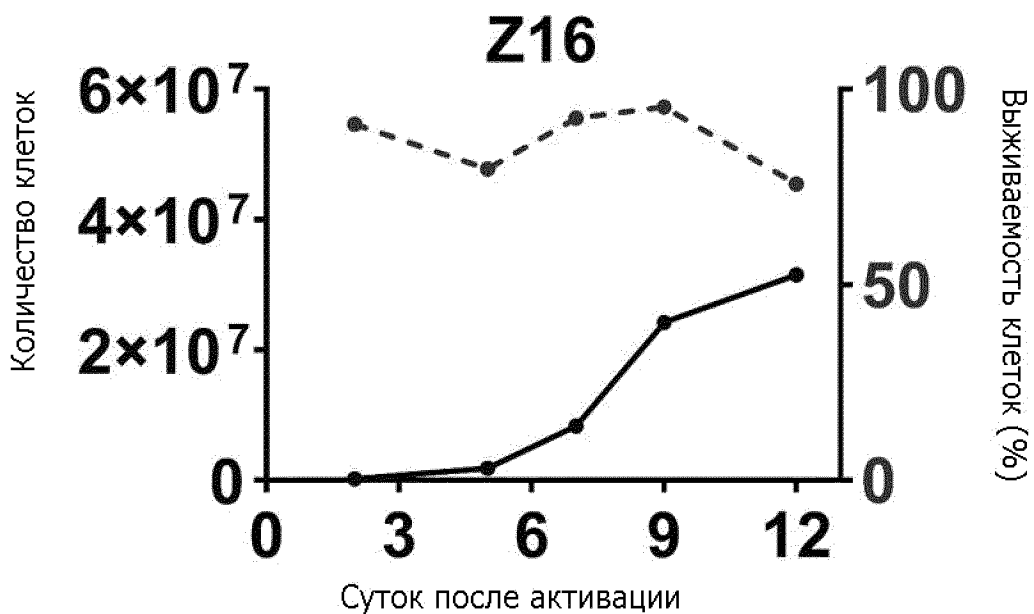
Фиг. 6G



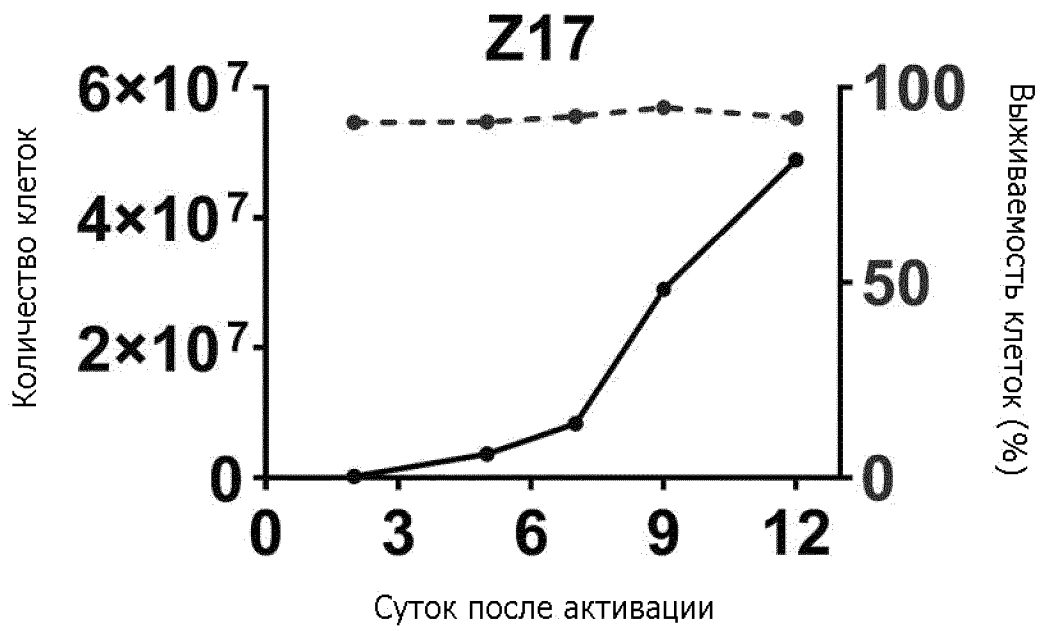
Фиг. 6H



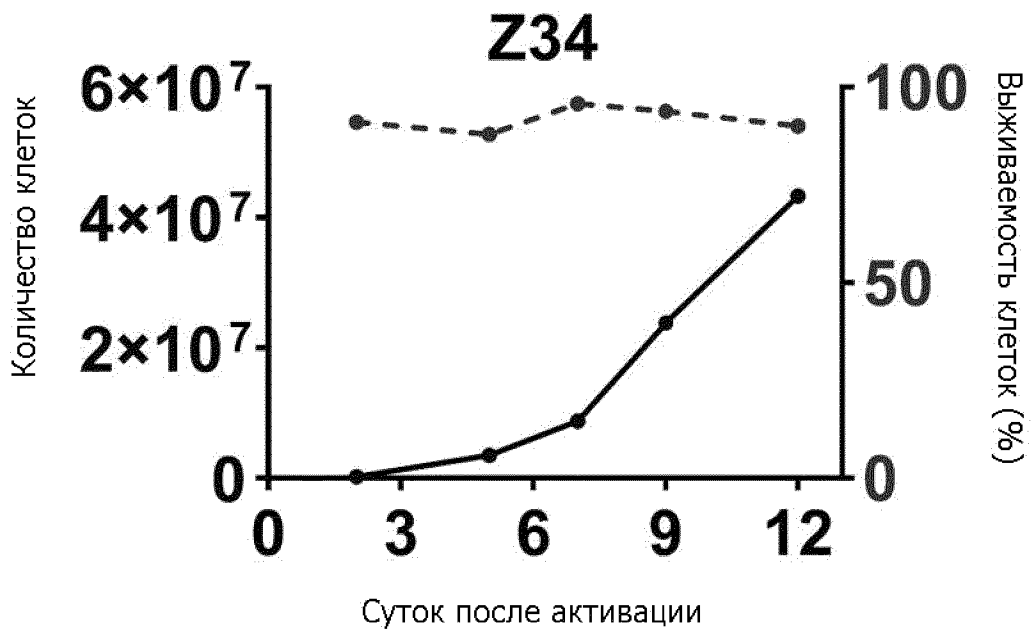
Фиг. 6I



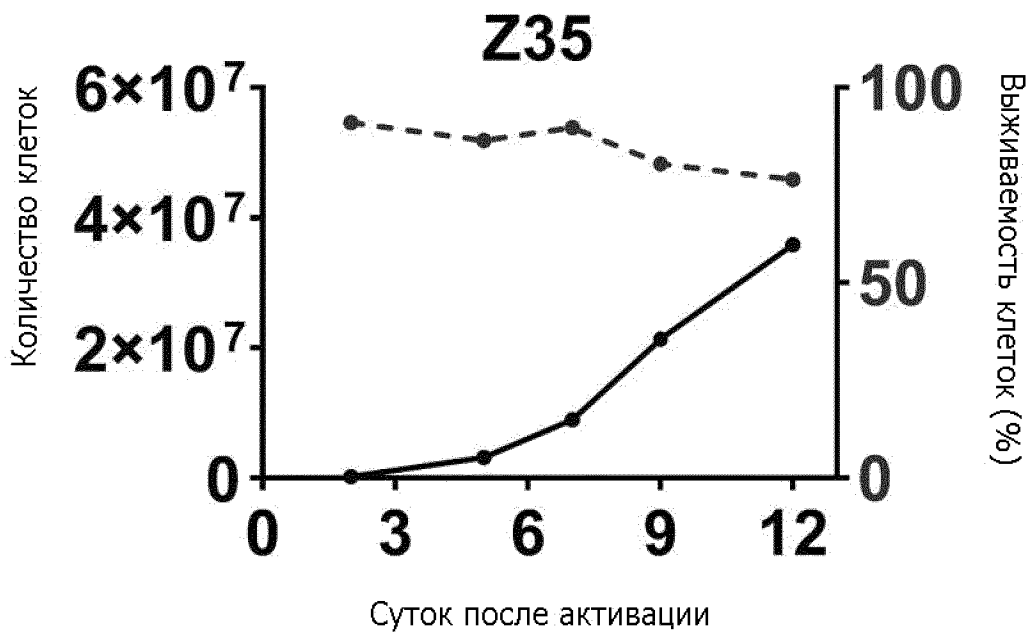
Фиг. 6J



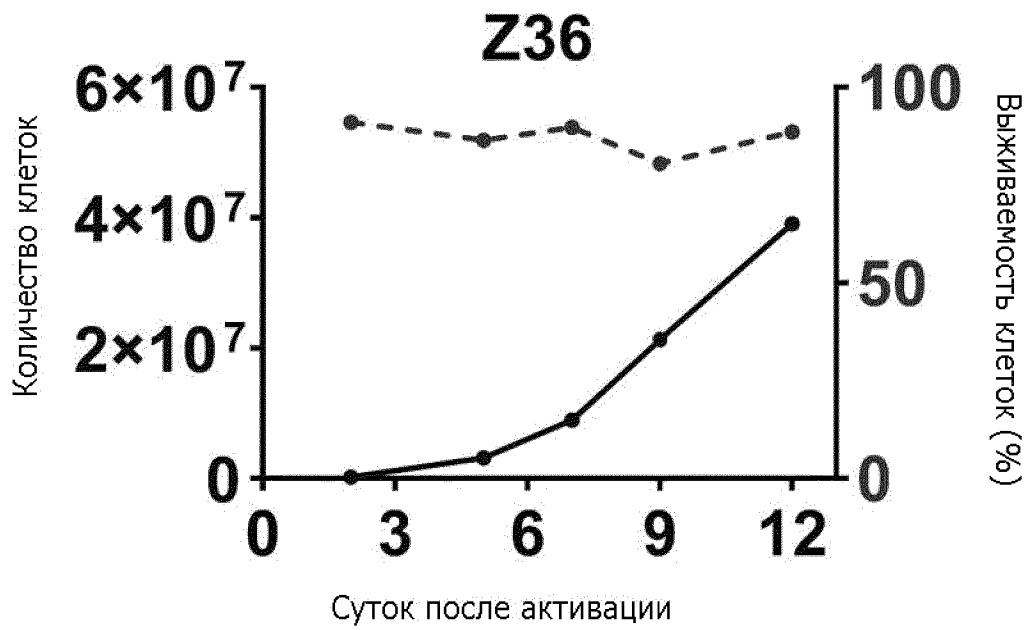
Фиг. 6К



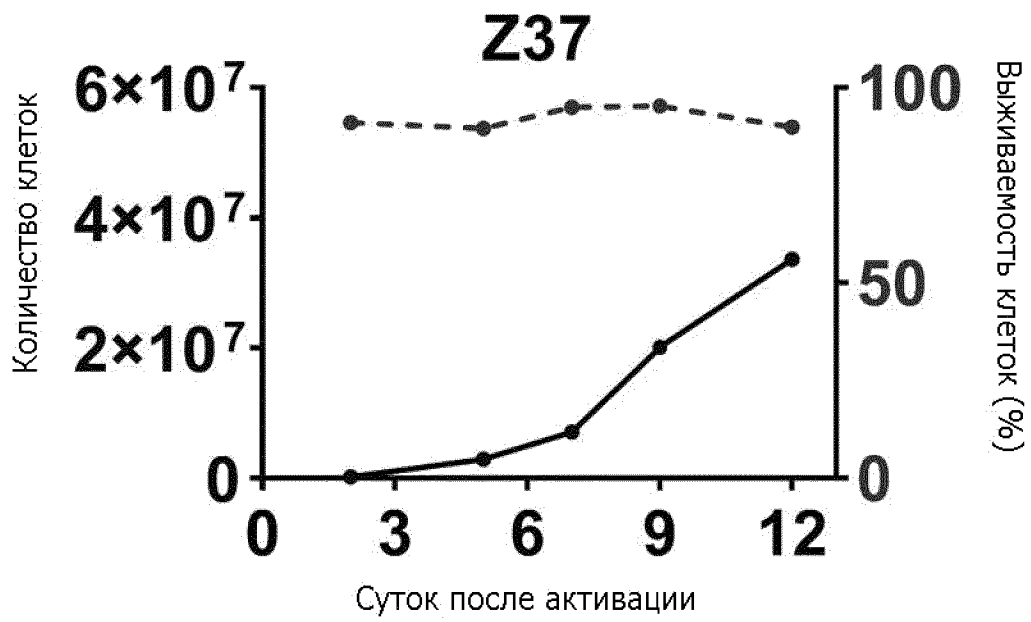
Фиг. 6Л



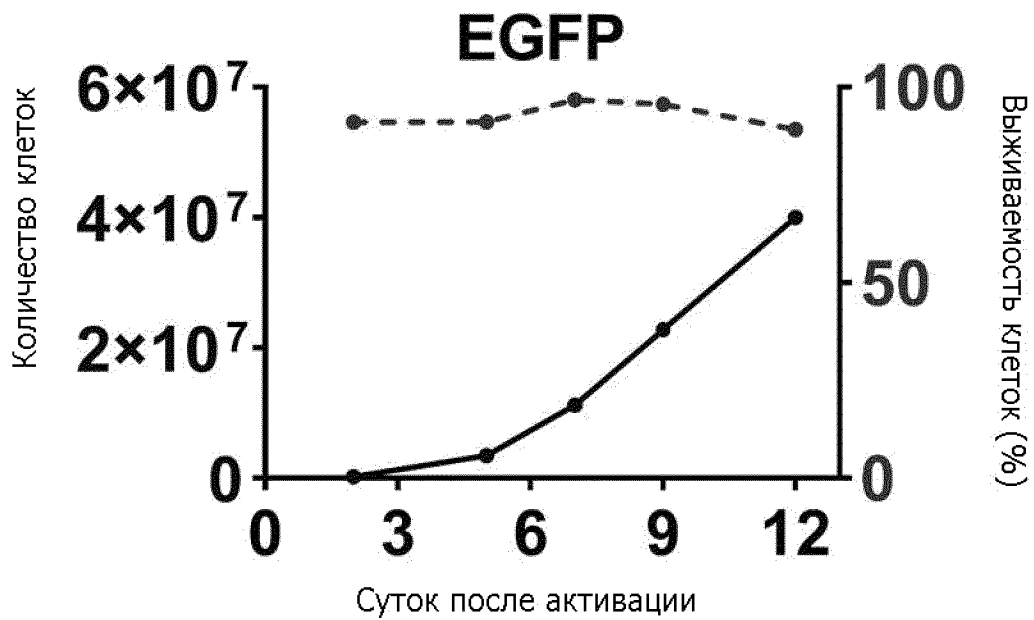
Фиг. 6М



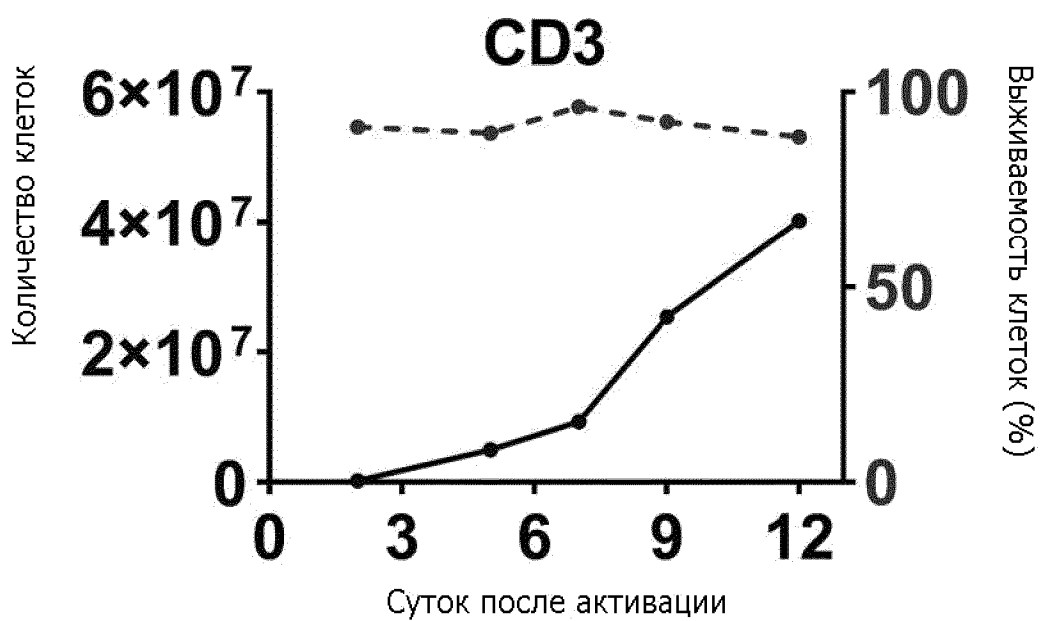
Фиг. 6N



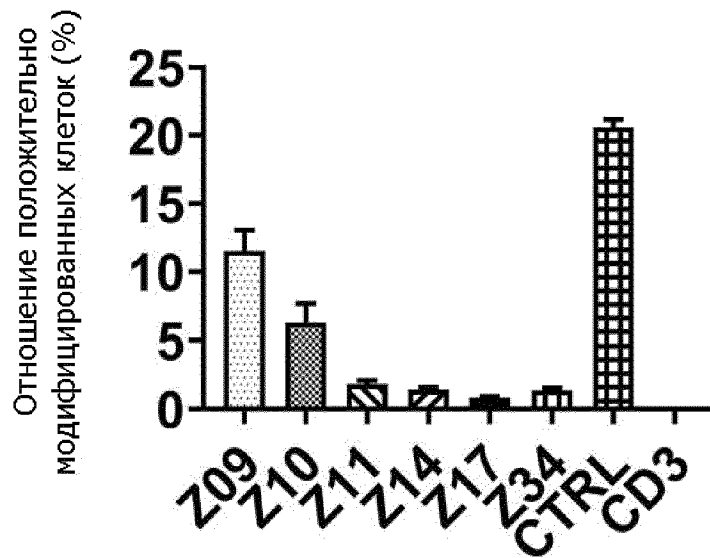
Фиг. 60



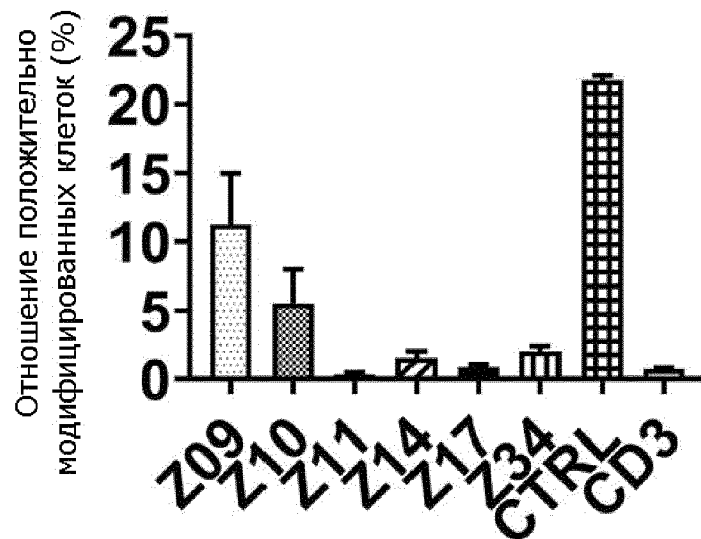
Фиг. 6P



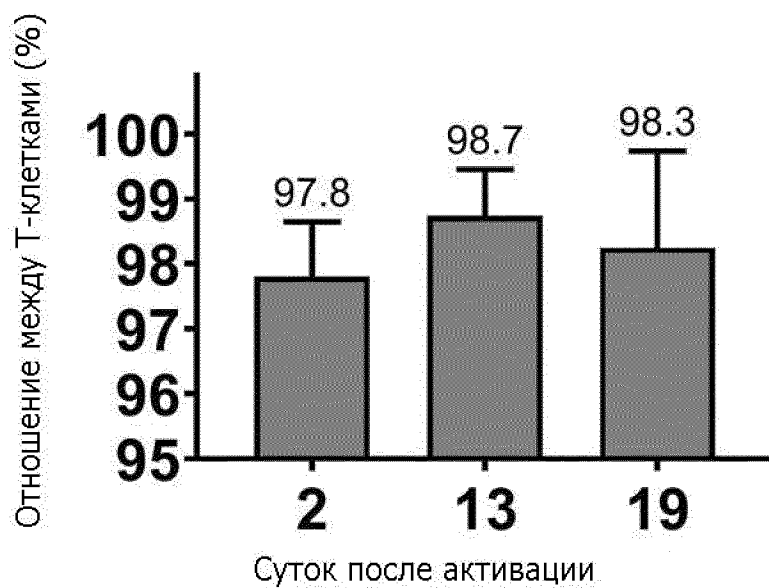
Фиг. 6Q



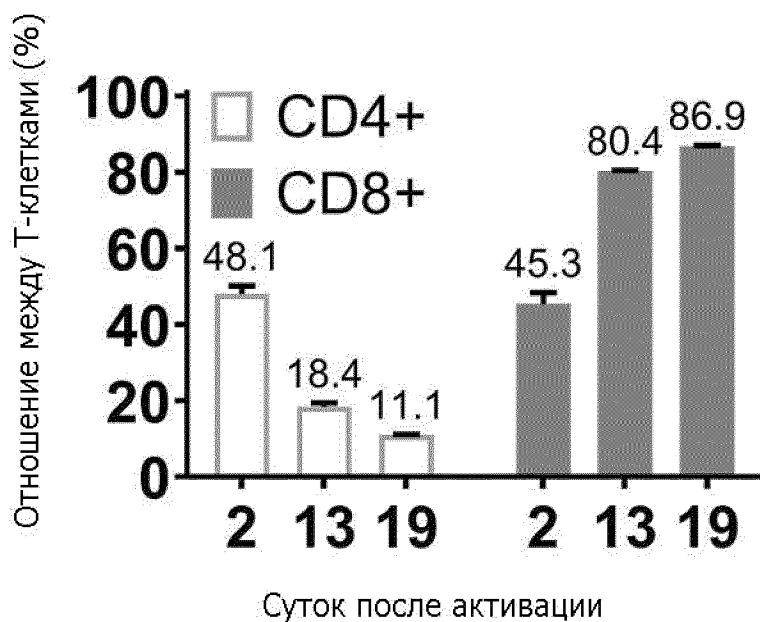
Фиг. 7А



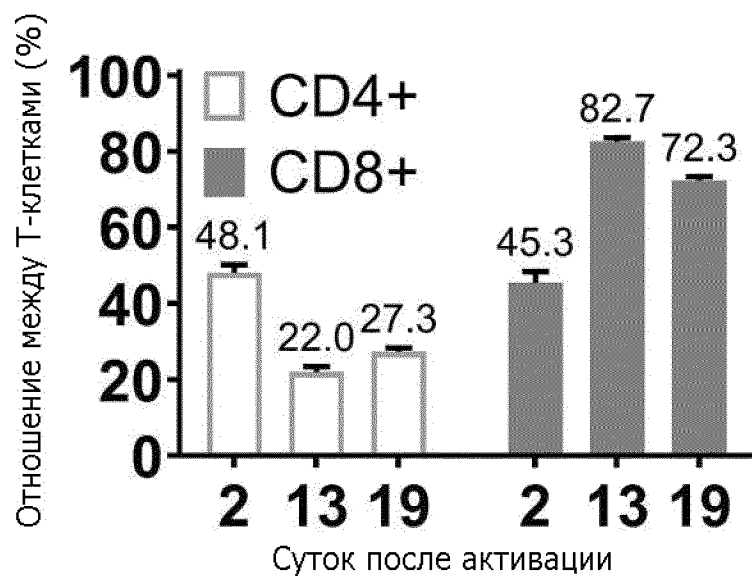
Фиг. 7В



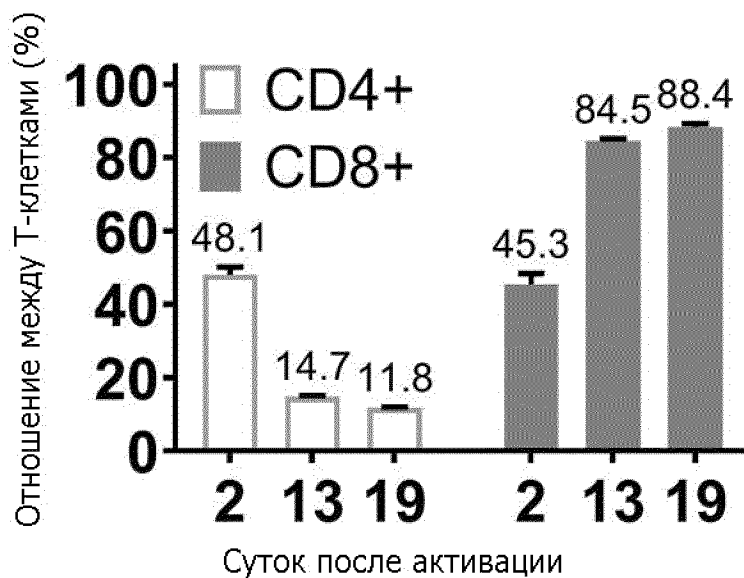
Фиг. 8А



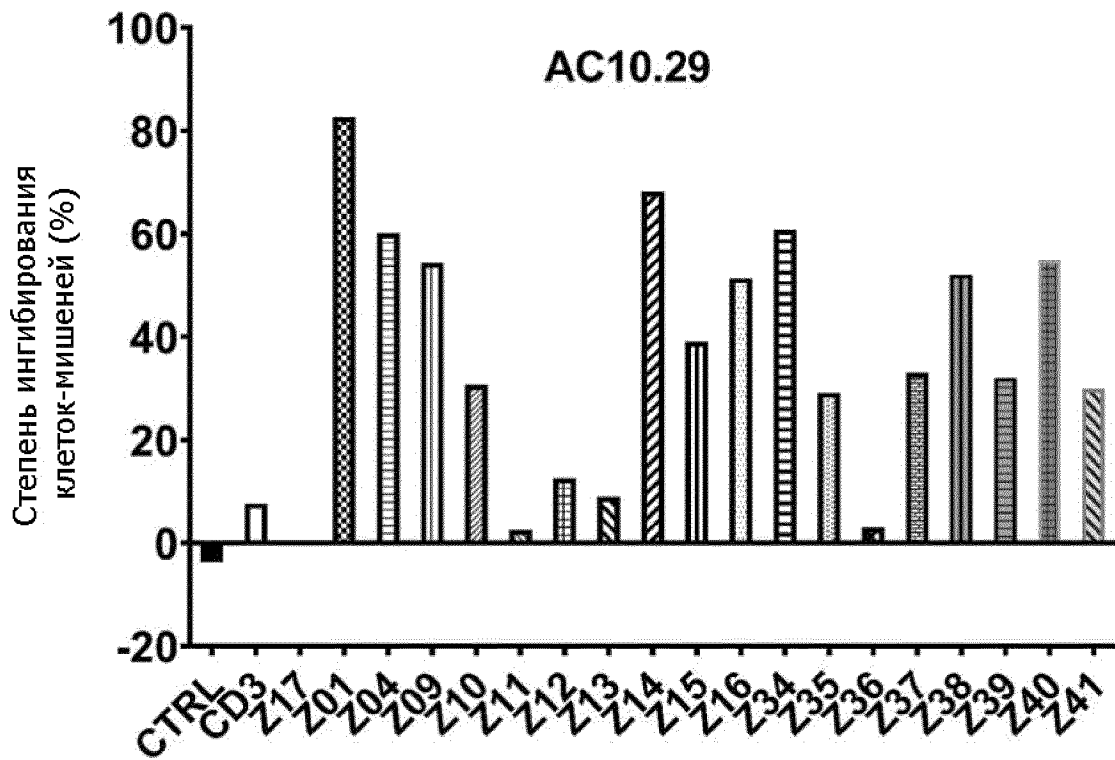
Фиг. 8В



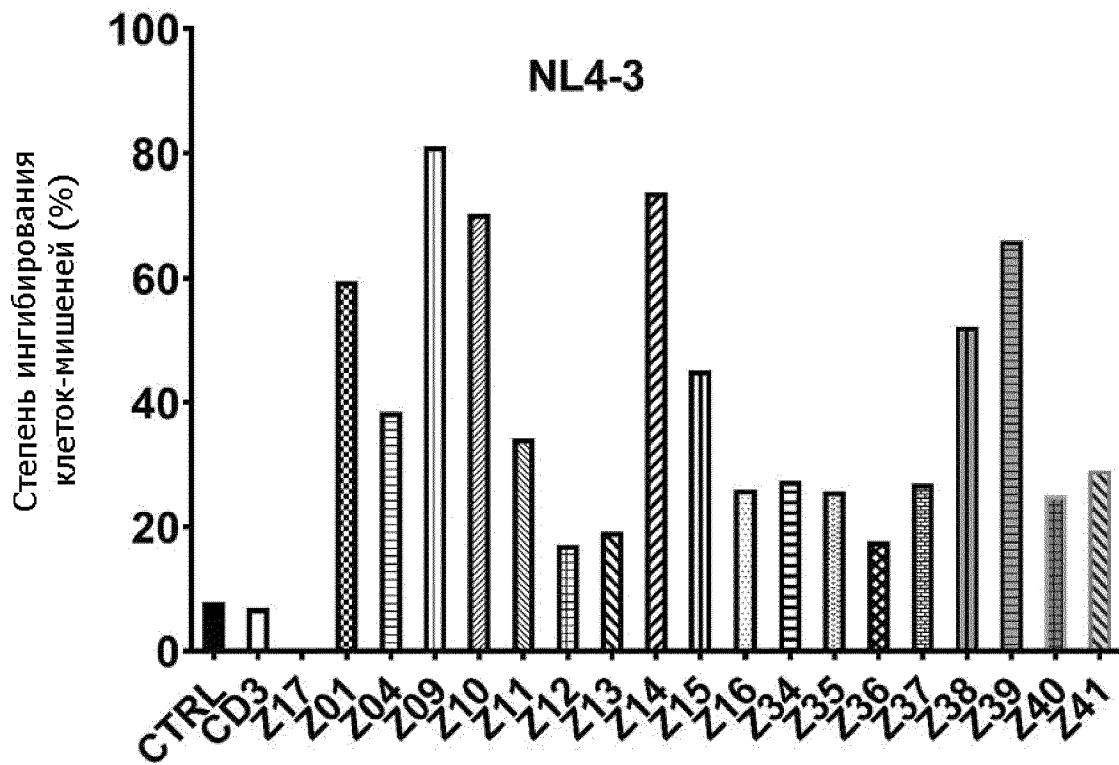
Фиг. 9А



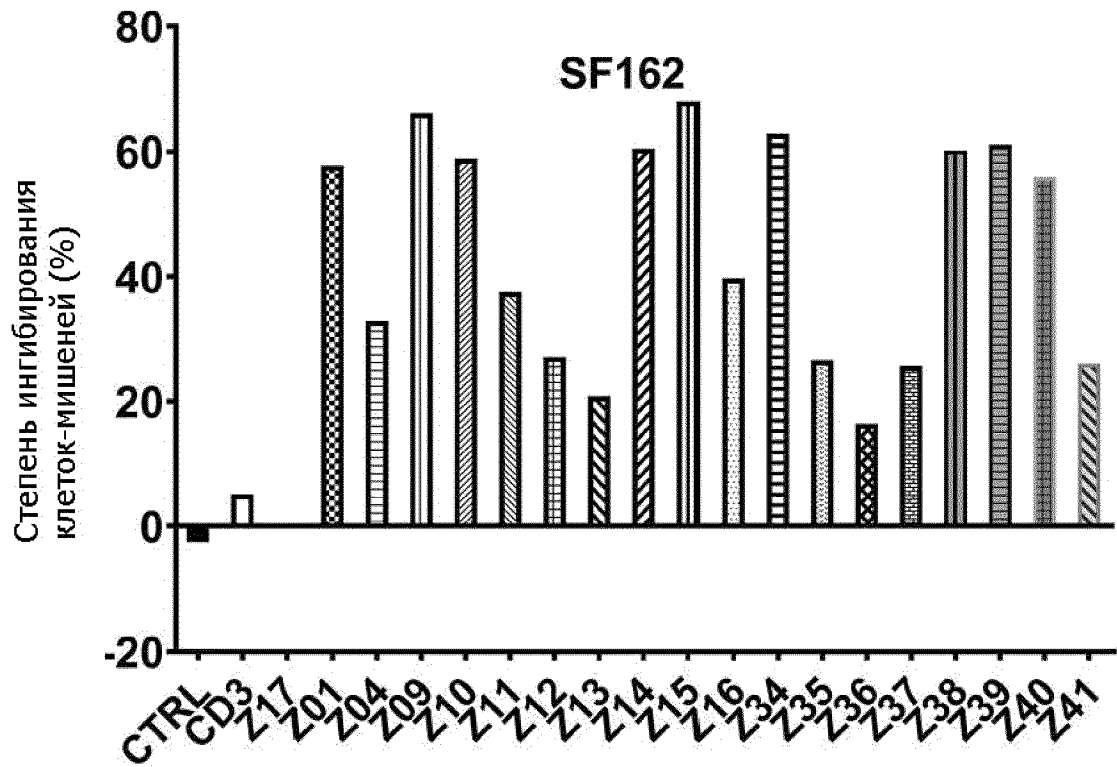
Фиг. 9В



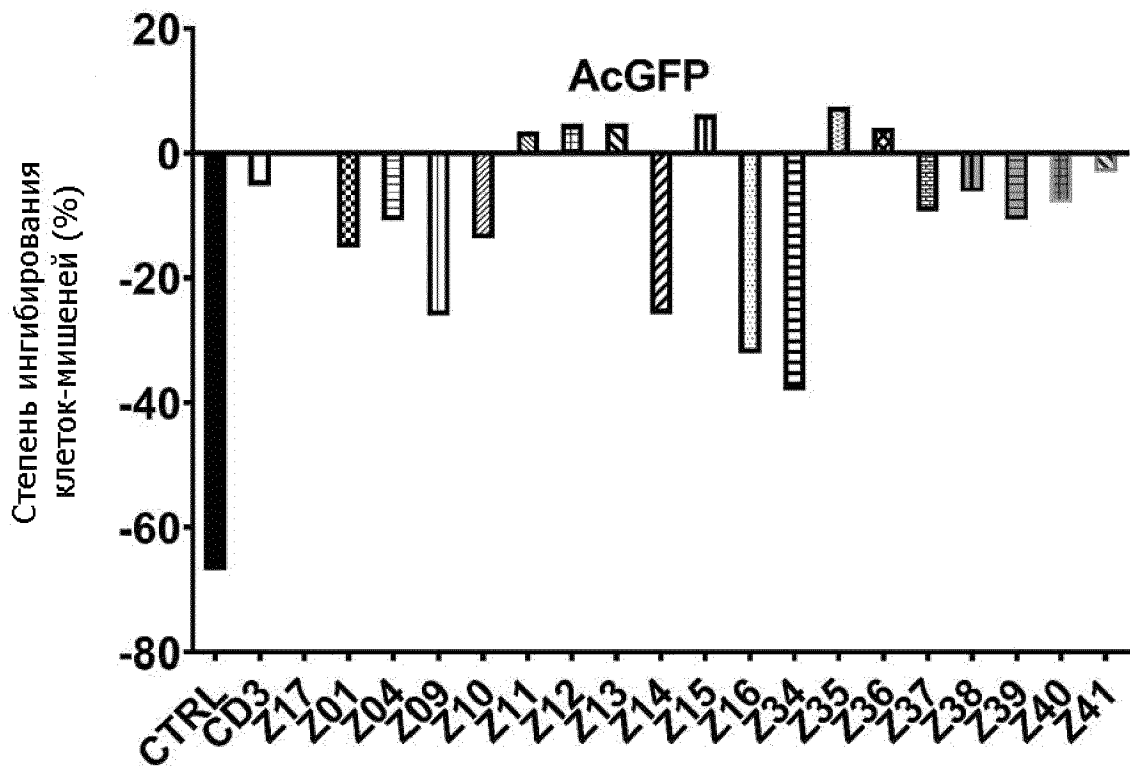
Фиг. 10А



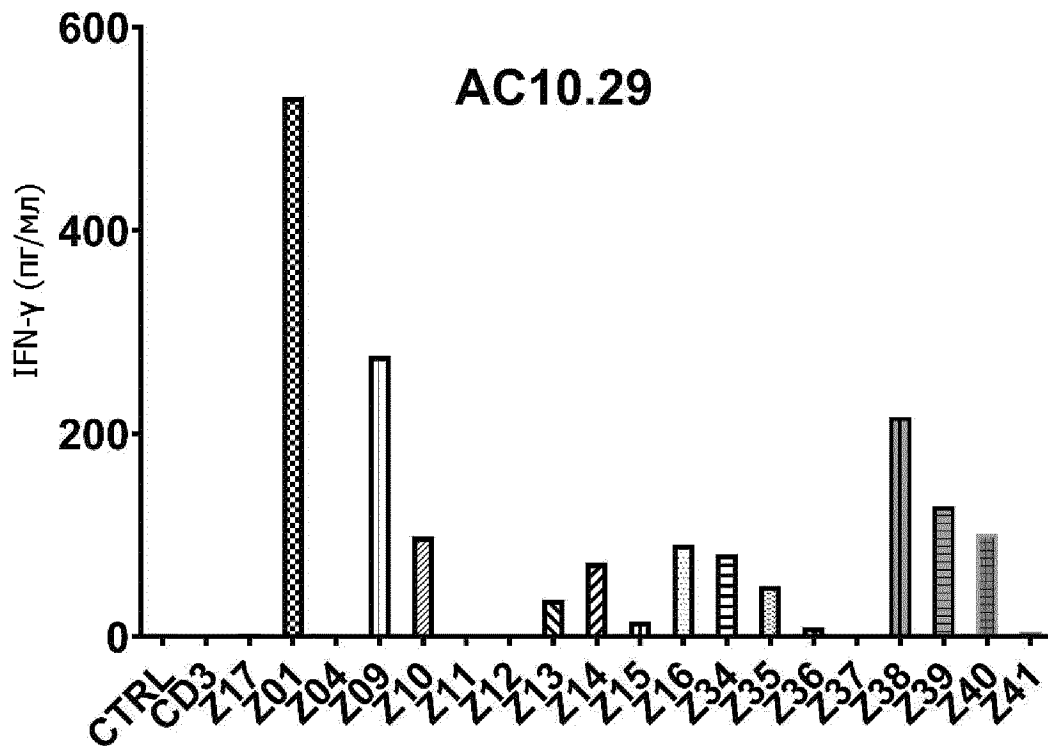
Фиг. 10В



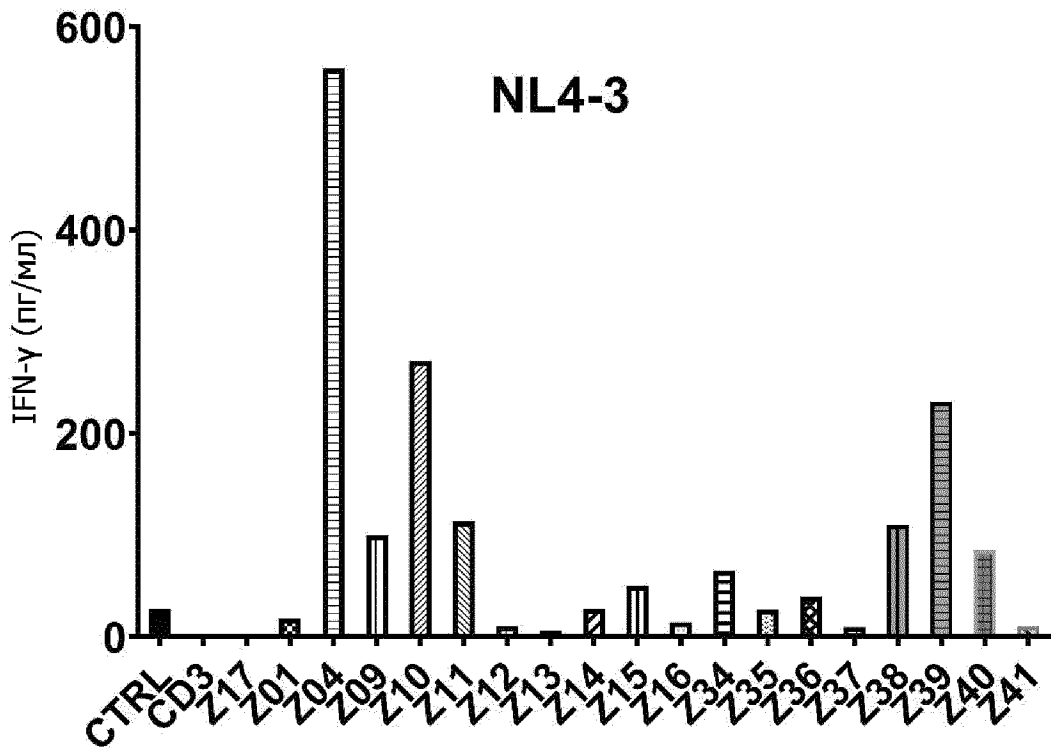
Фиг. 10С



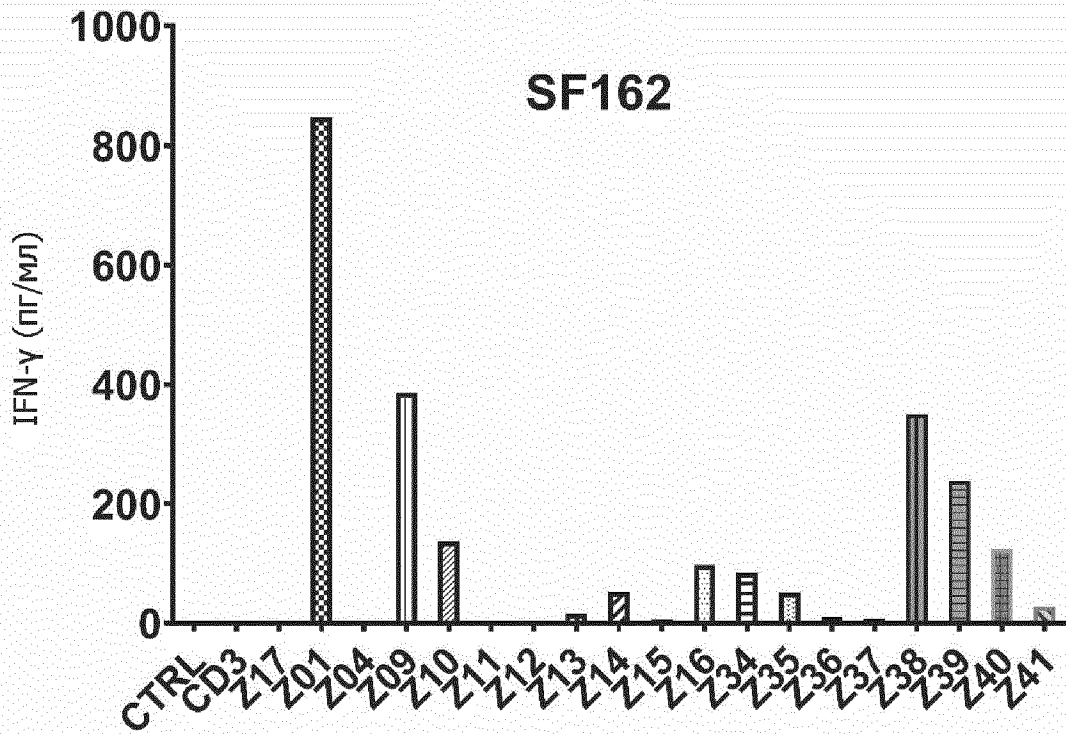
Фиг. 10D



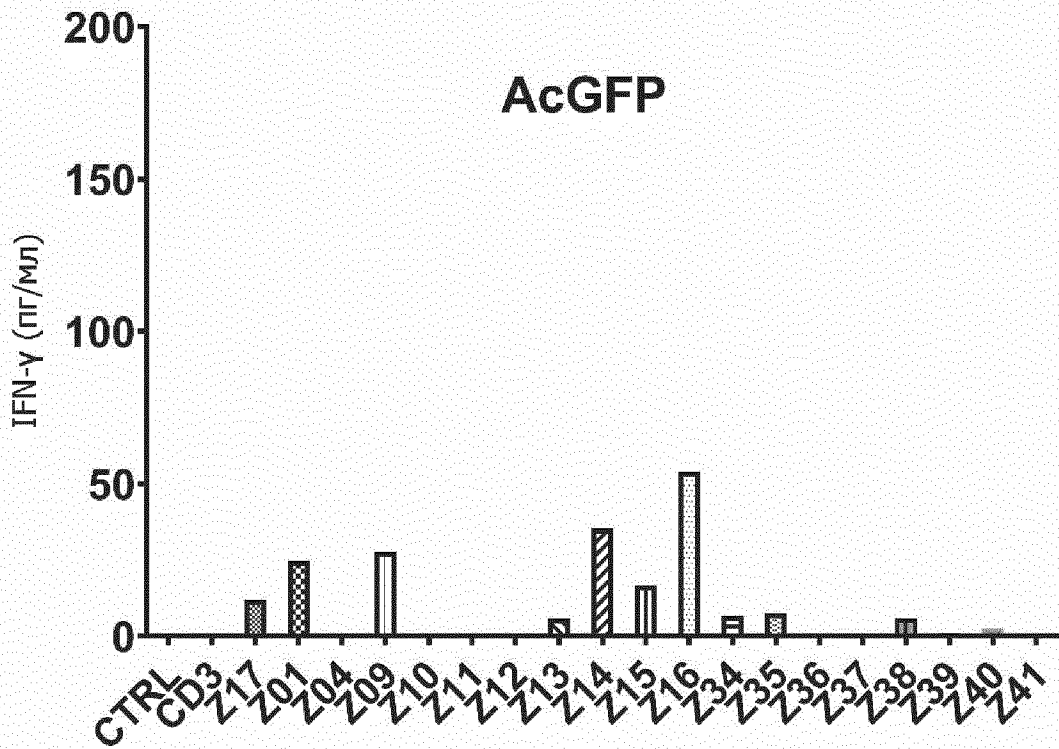
Фиг. 11А



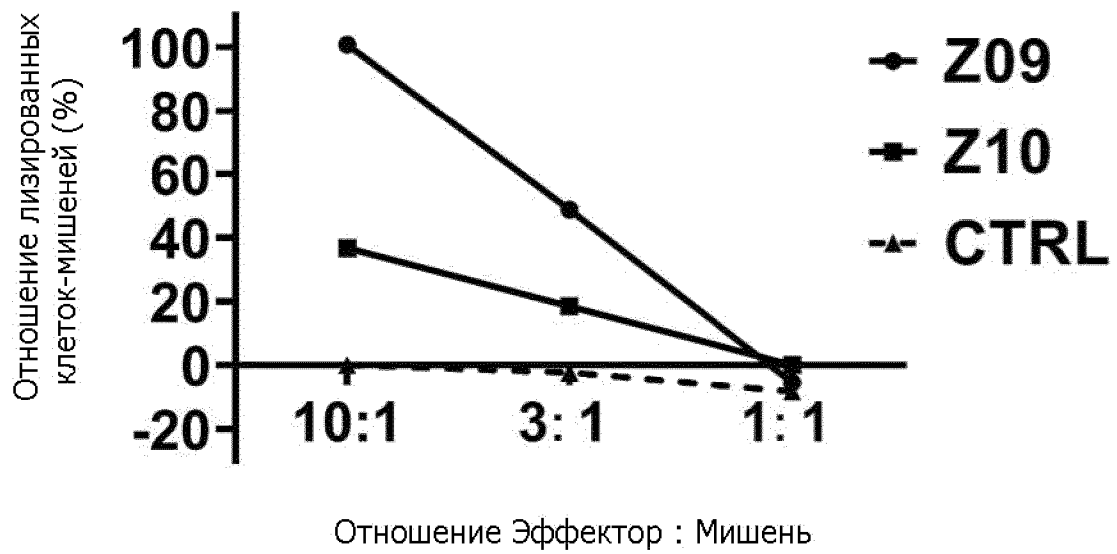
Фиг. 11В



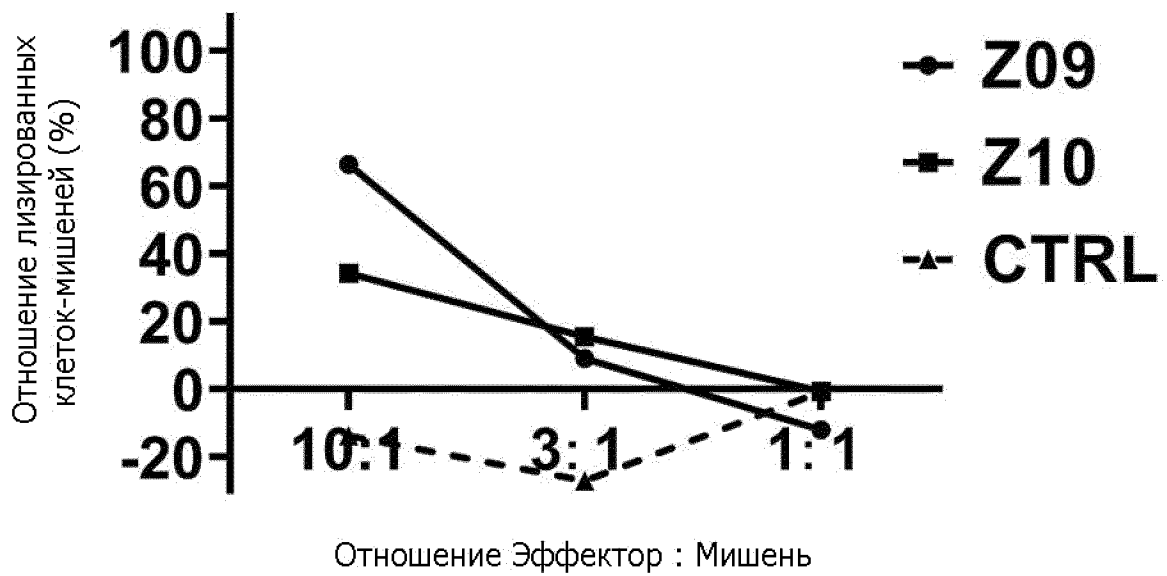
Фиг. 11С



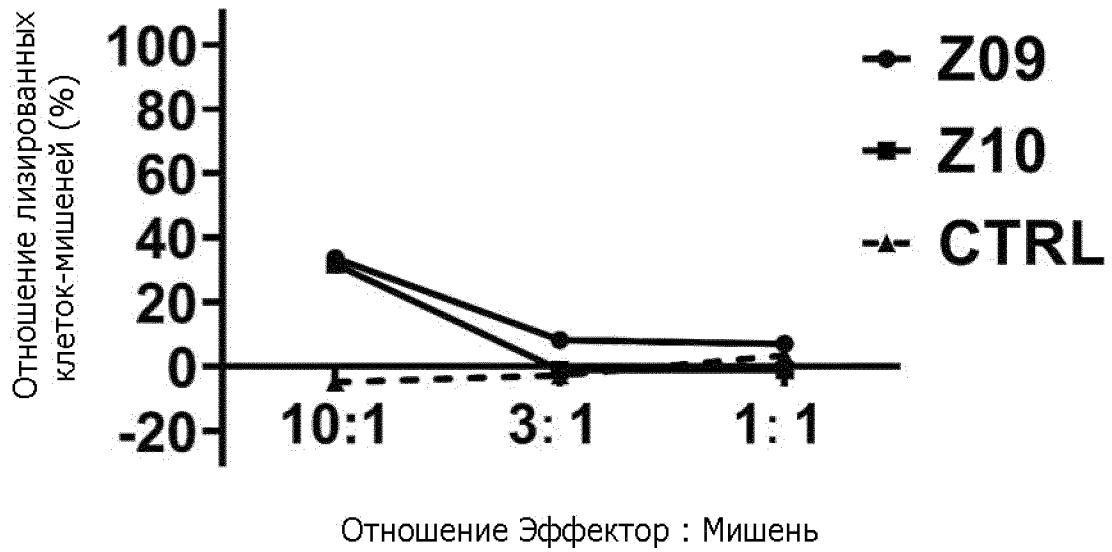
Фиг. 11D

AC10.29

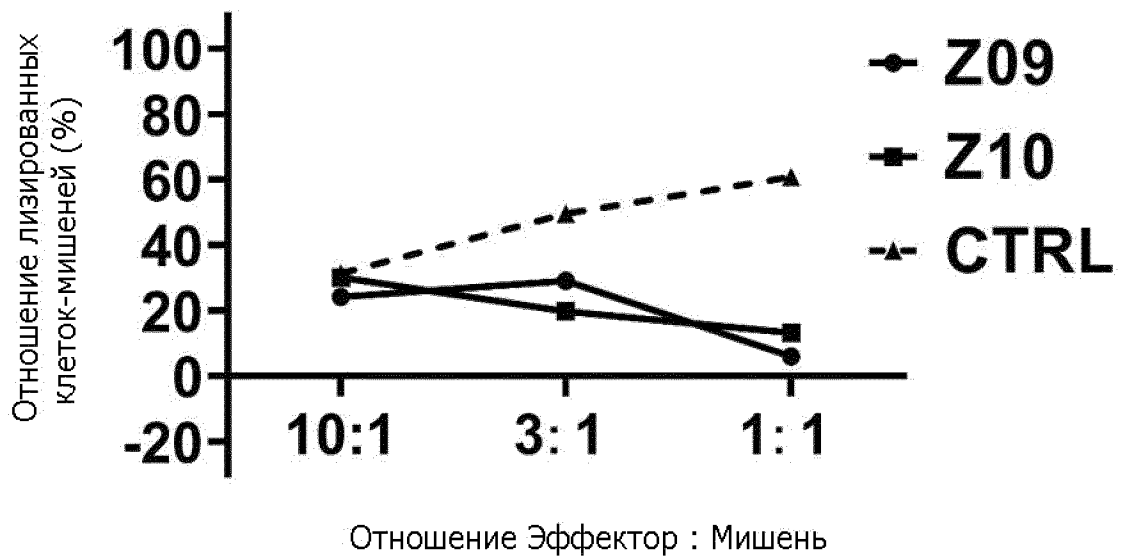
Фиг. 12А

NL4-3

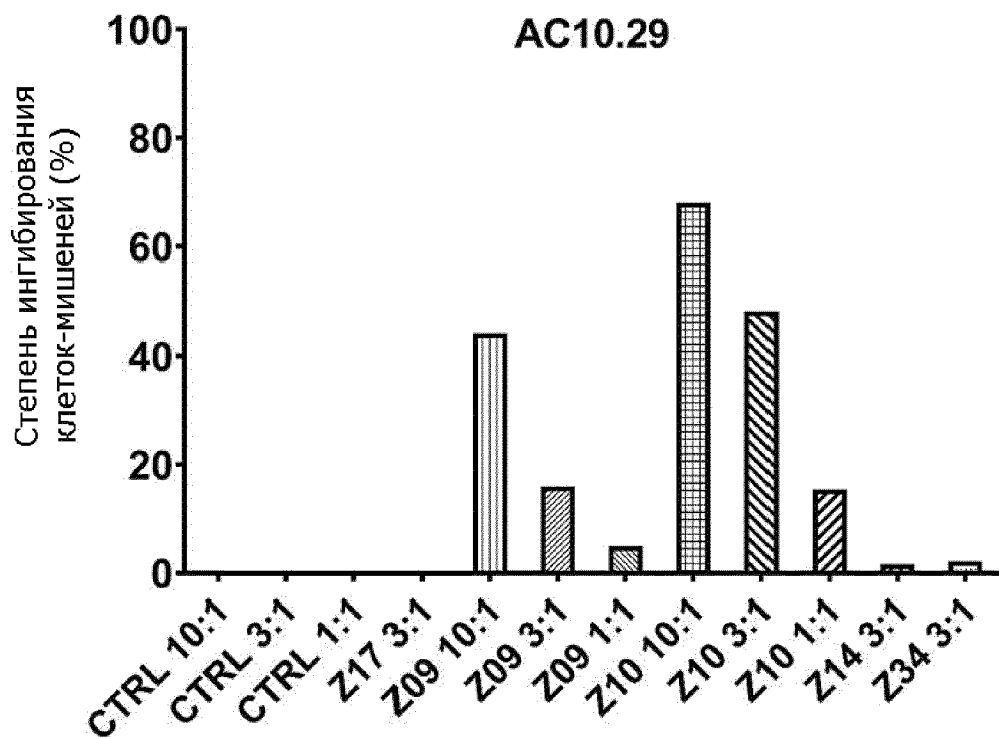
Фиг. 12В

SF162

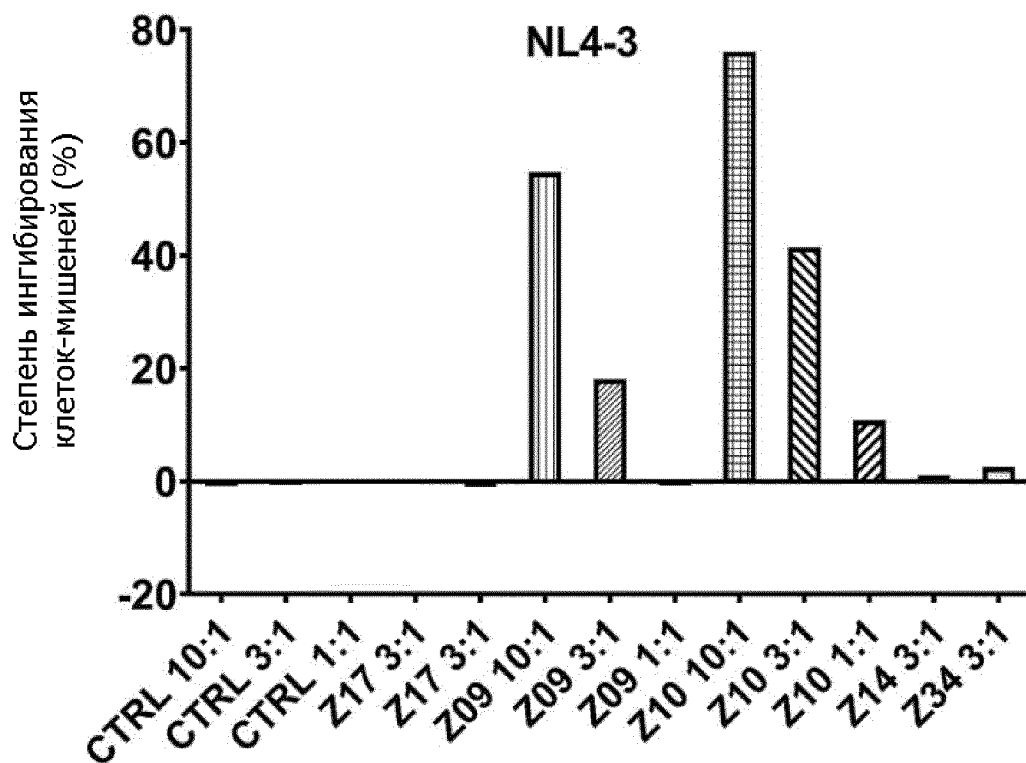
Фиг. 12С

DR0401

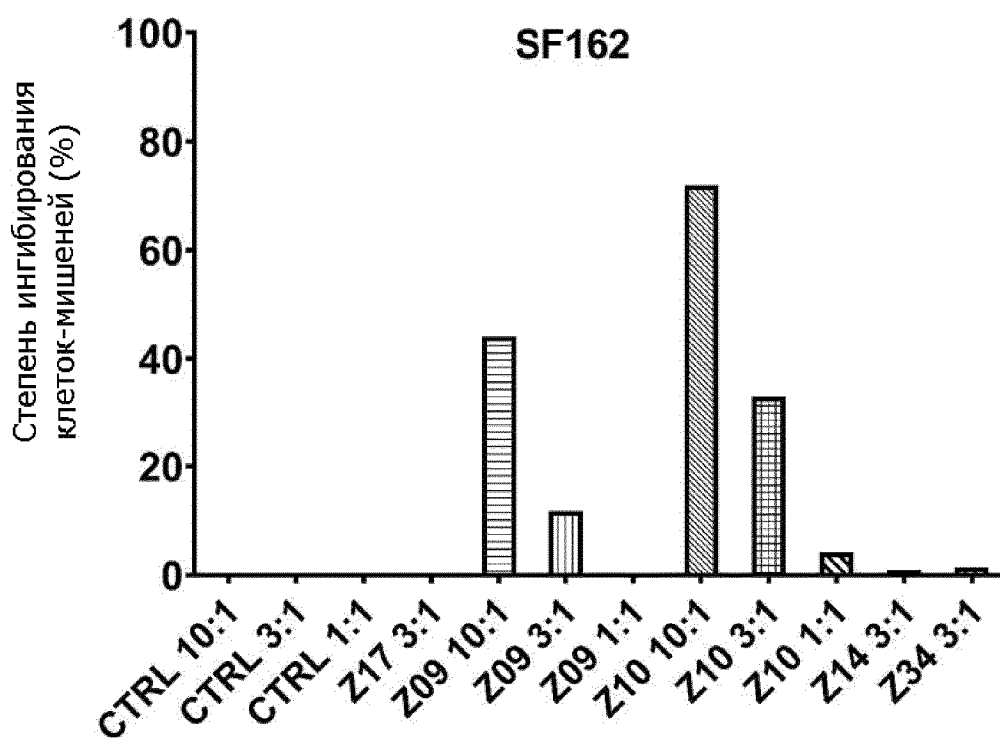
Фиг. 12D



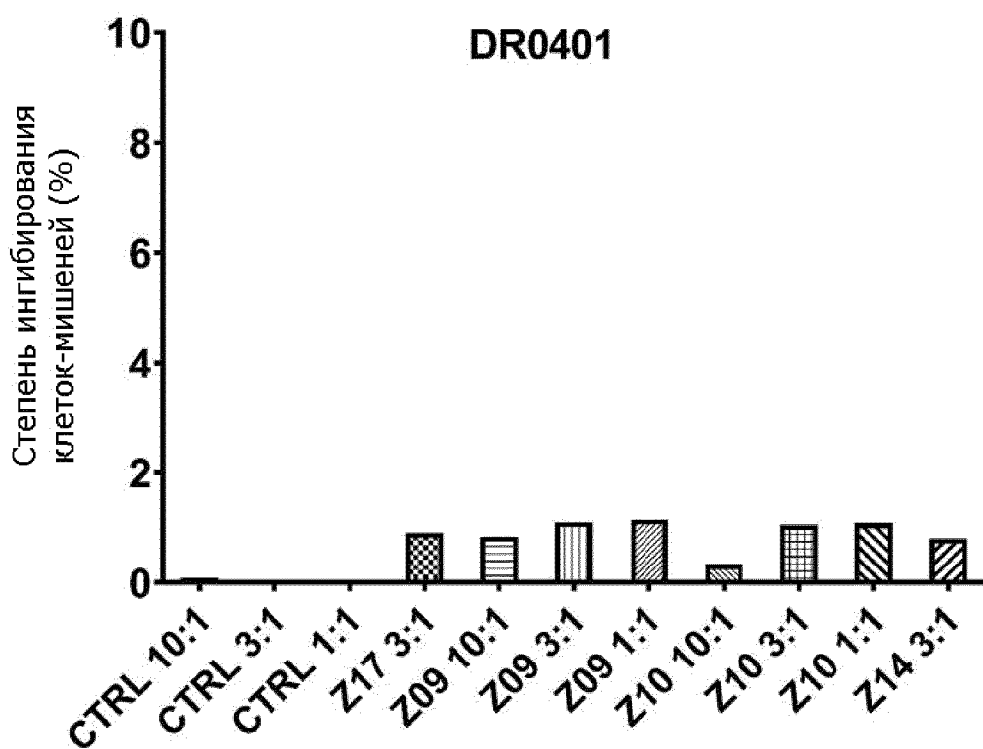
Фиг. 13А



Фиг. 13В

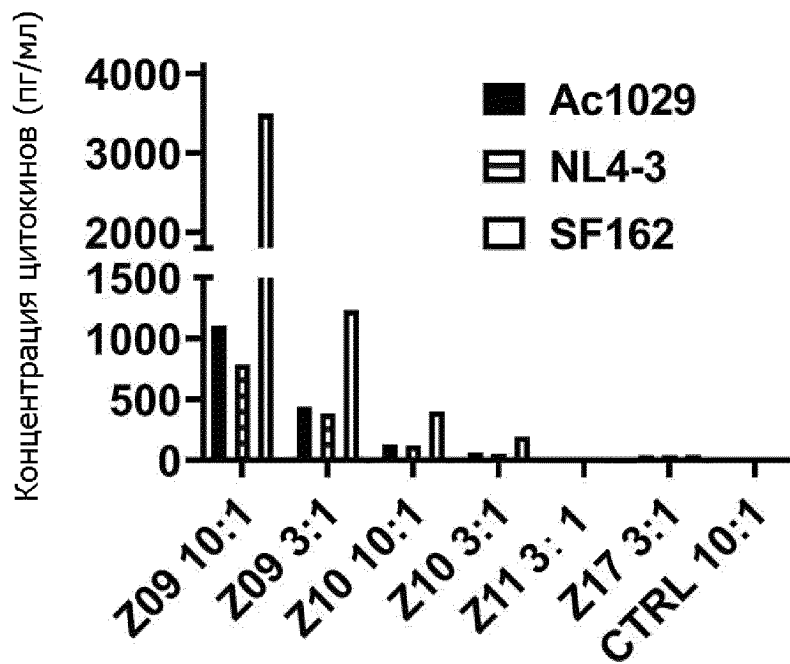


Фиг. 13С



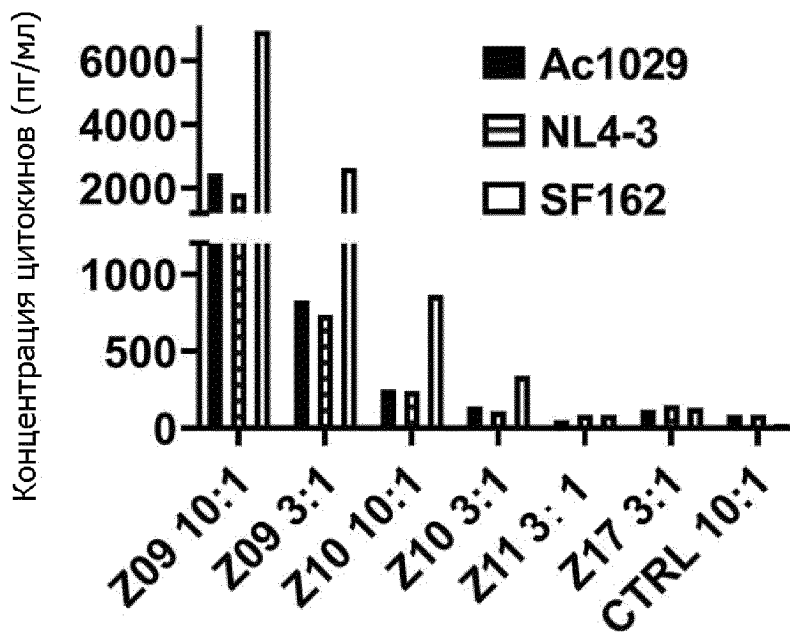
Фиг. 13D

CCL3/MIP-1 альфа



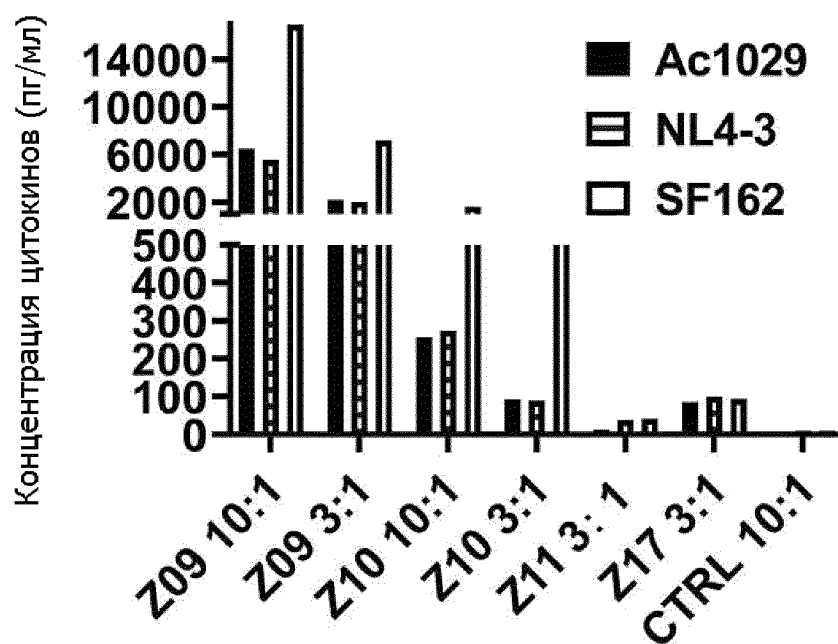
Фиг. 14А

CCL4/MIP-1 бета



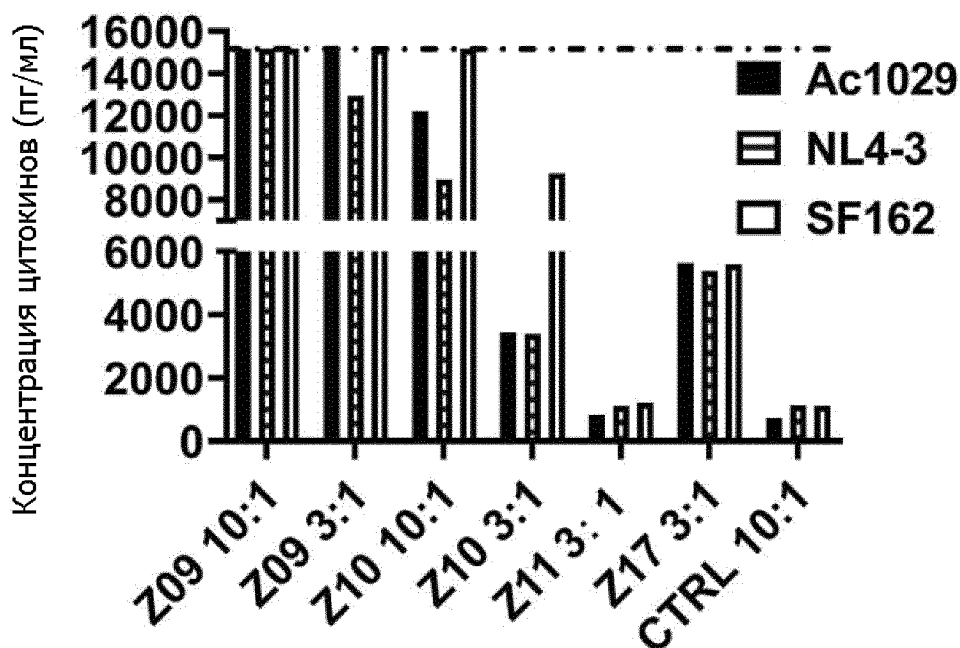
Фиг. 14В

GM-CSF



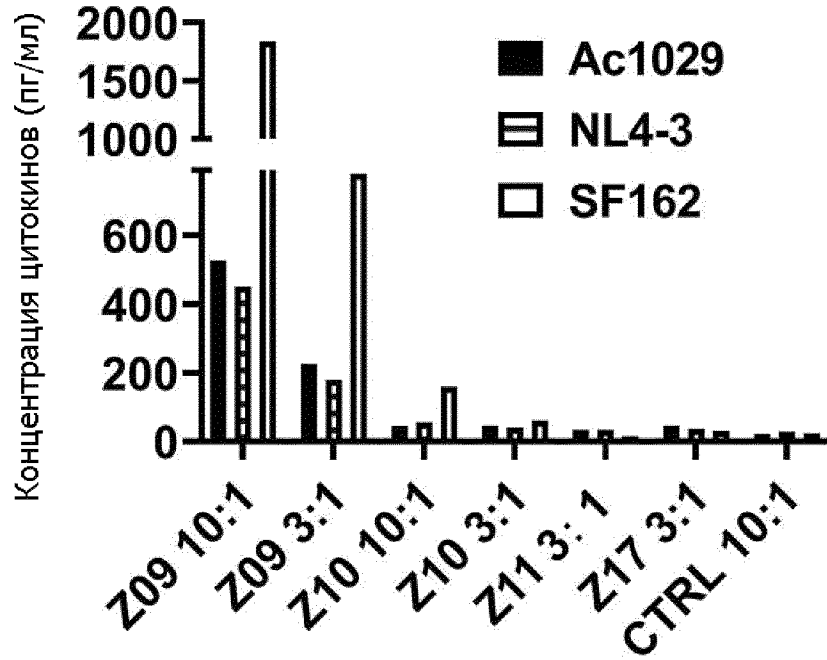
Фиг. 14С

Гранзим В



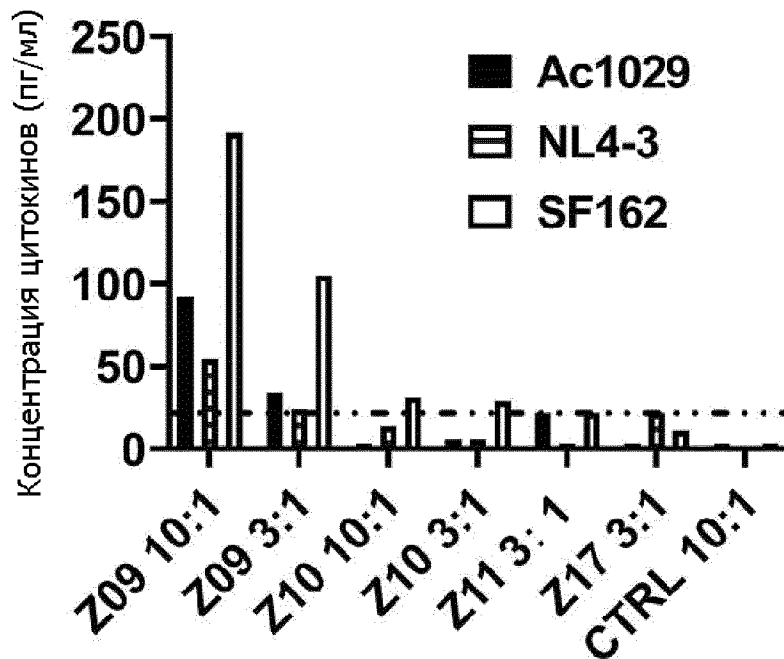
Фиг. 14D

IFN- γ



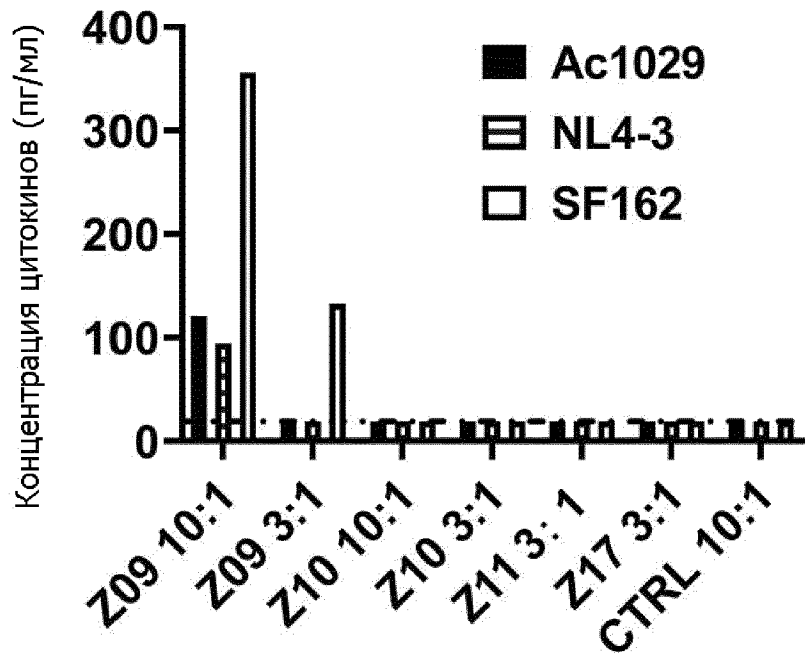
Фиг. 14E

IL-10



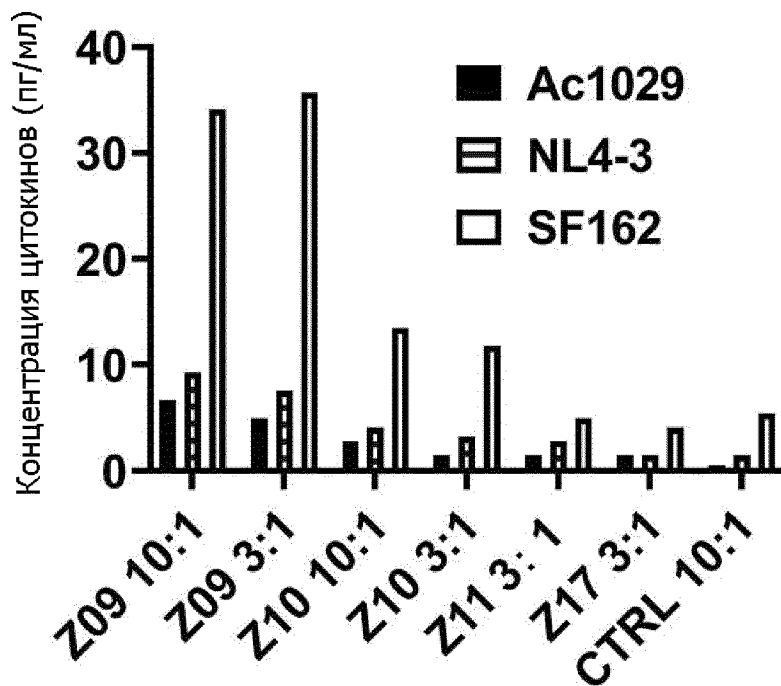
Фиг. 14F

IL-13



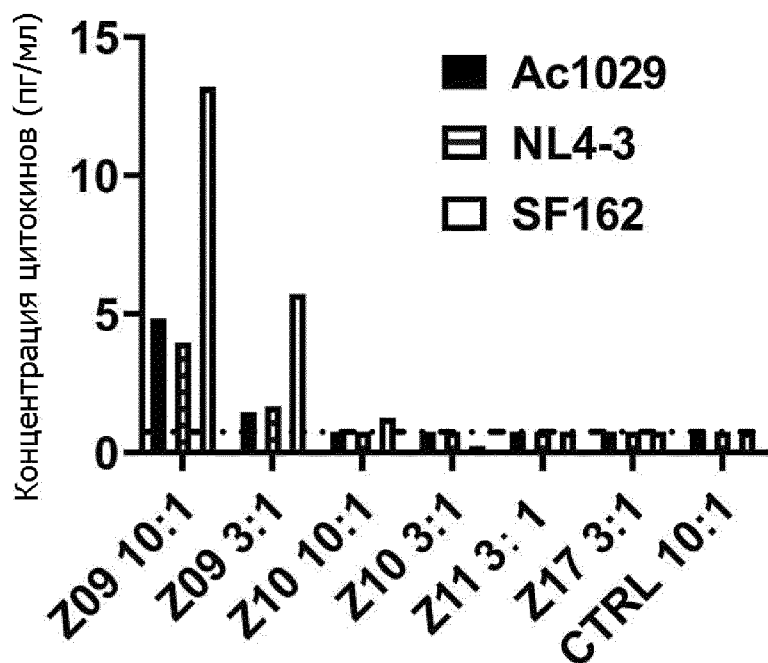
Фиг. 14G

IL-2



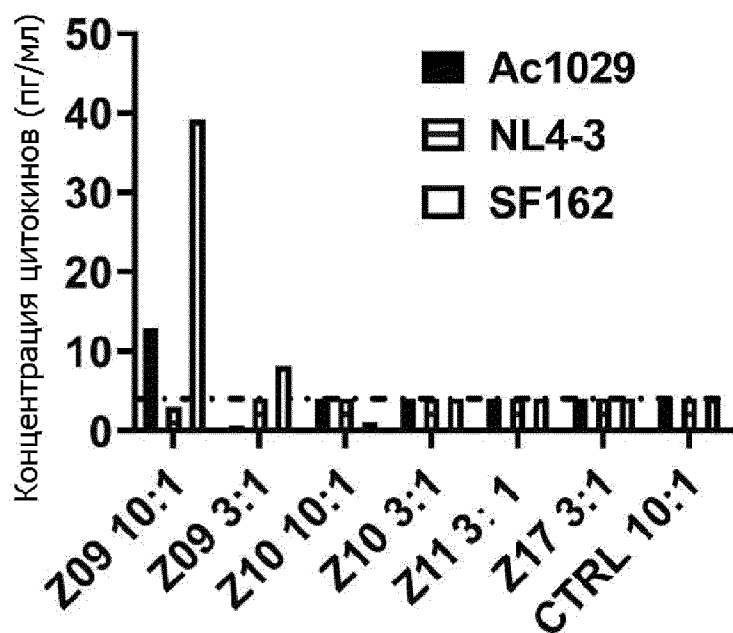
Фиг. 14H

IL-4



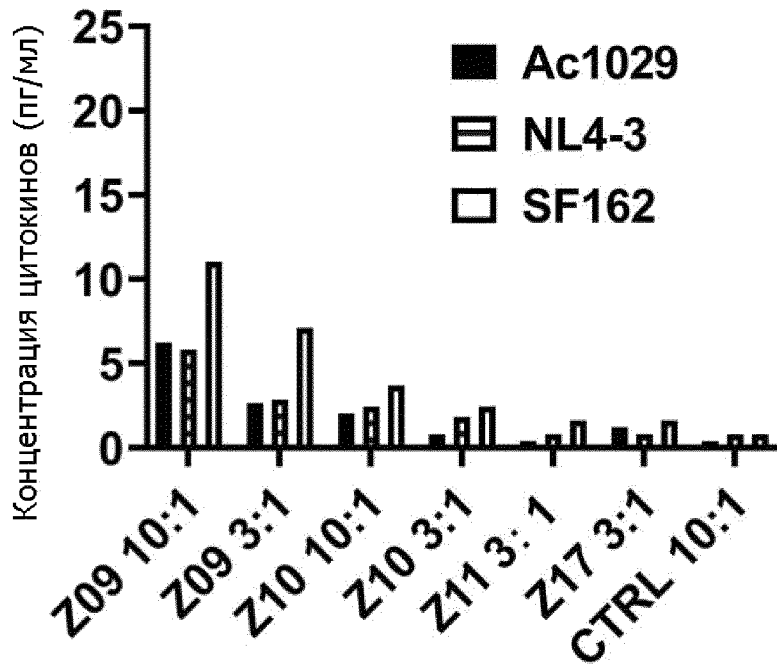
Фиг. 14I

IL-5



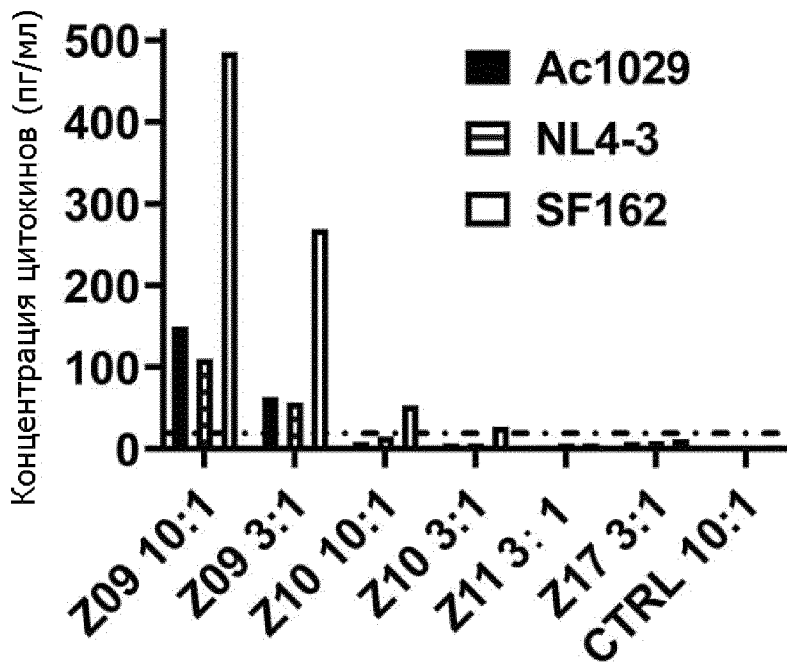
Фиг. 14J

IL-6

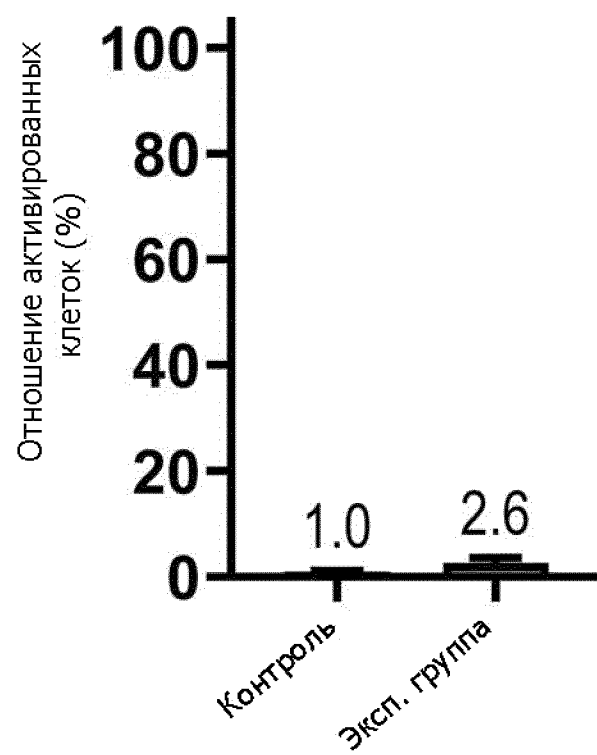


Фиг. 14К

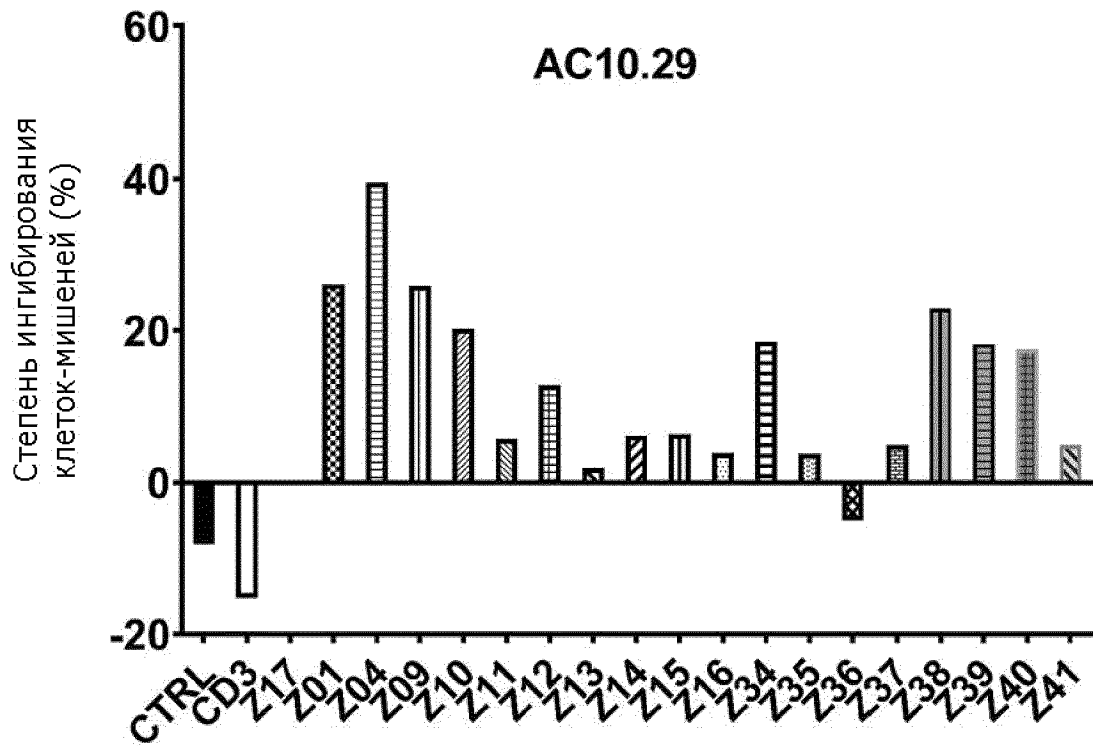
TNF- α



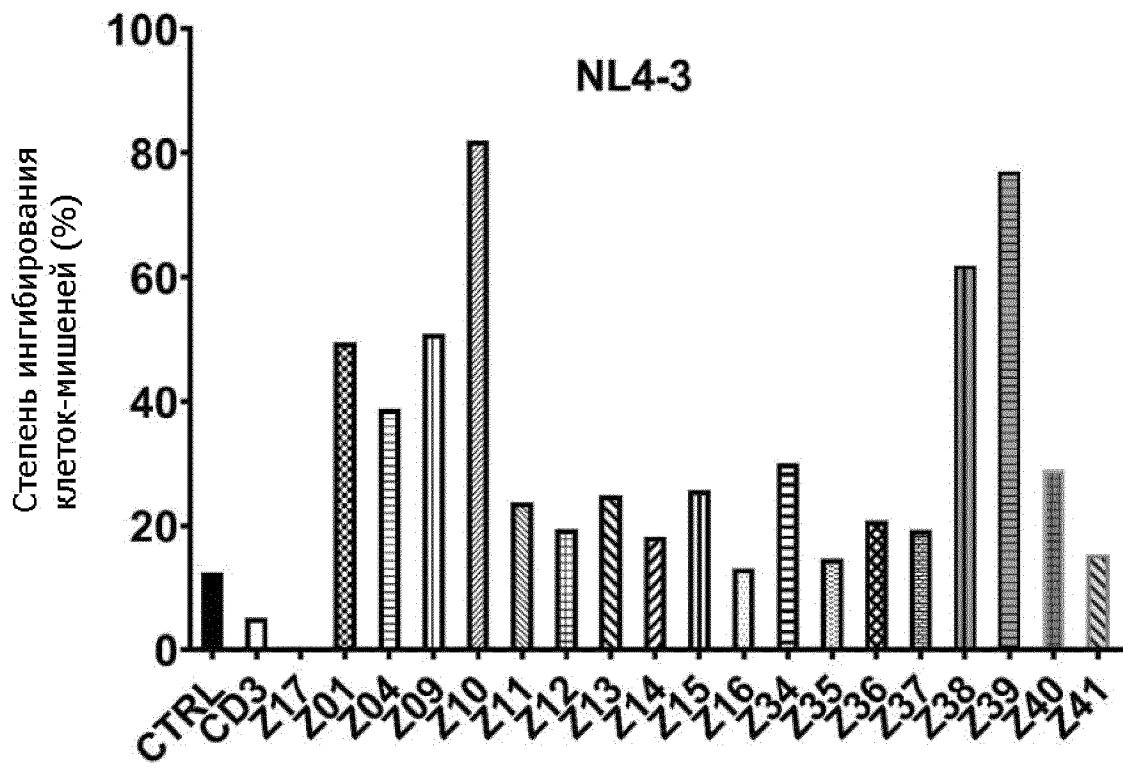
Фиг. 14L



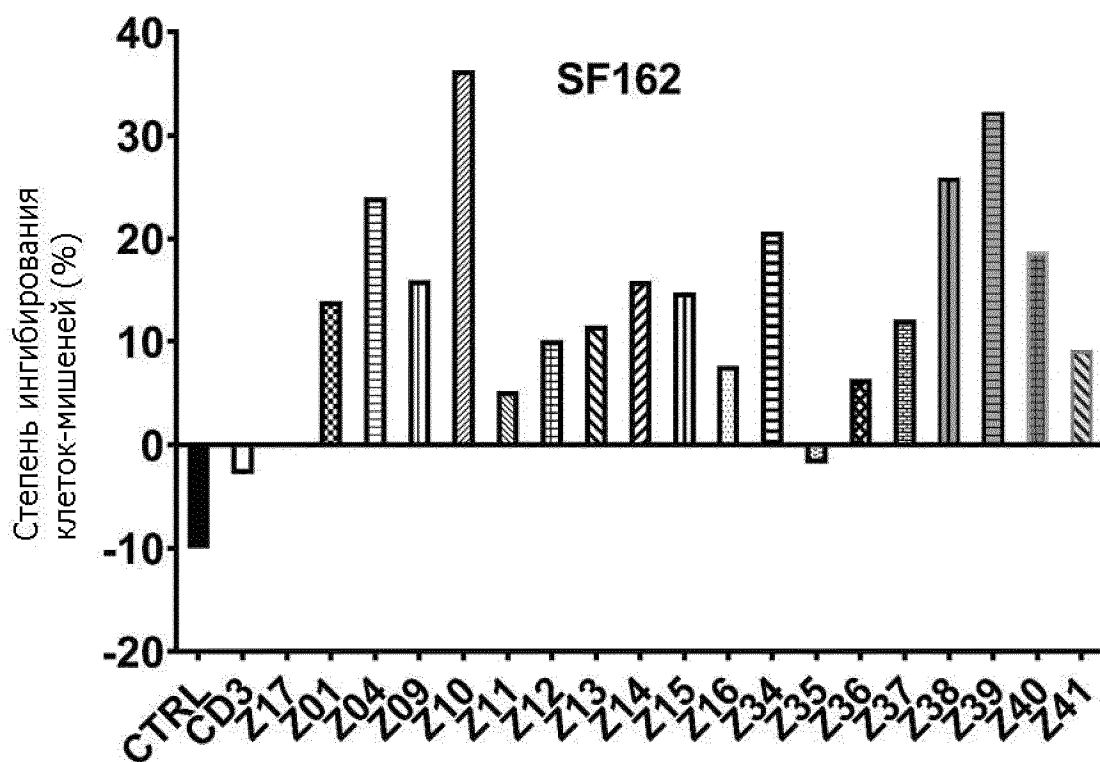
Фиг. 15



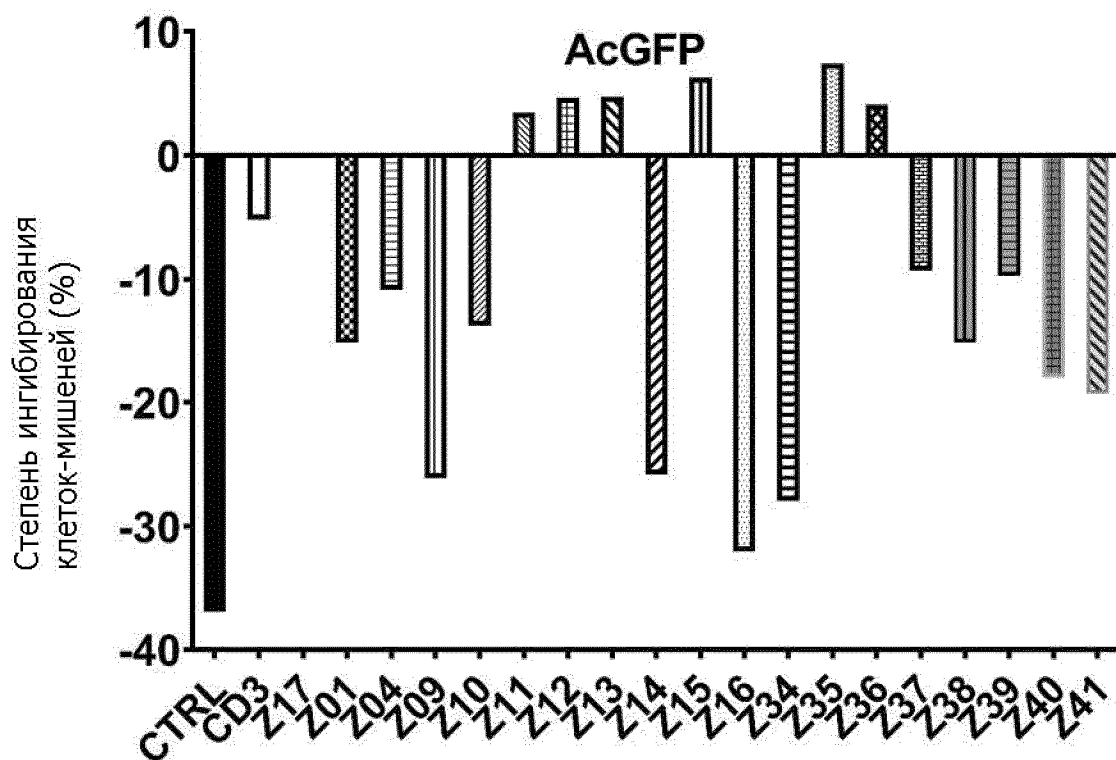
Фиг. 16А



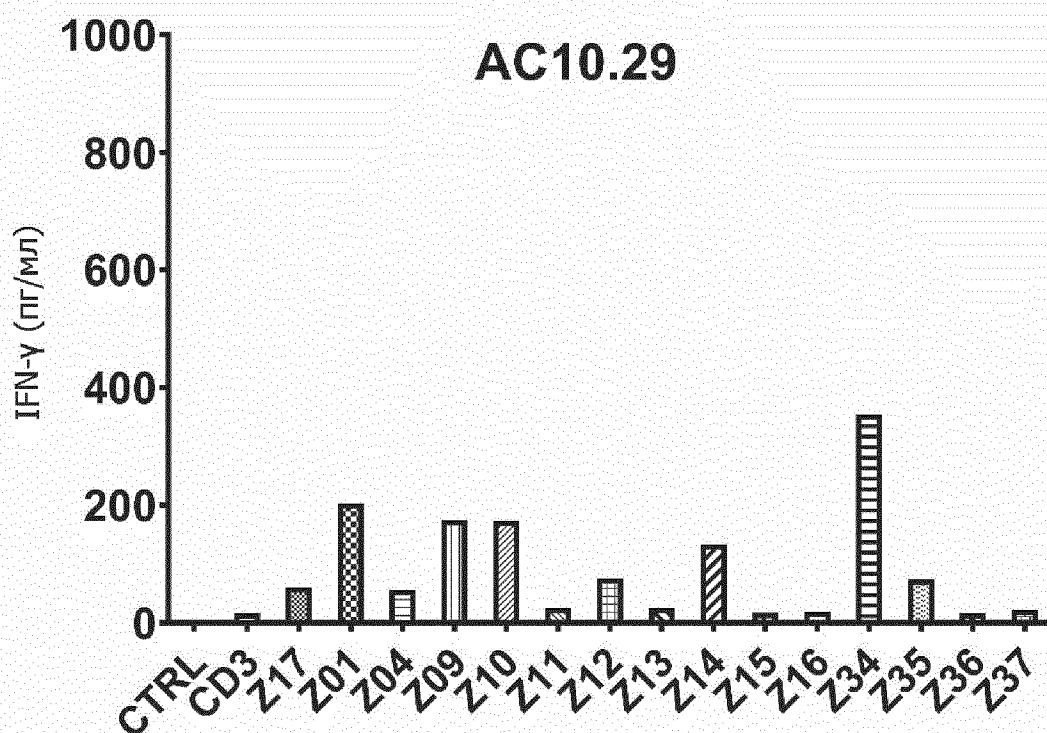
Фиг. 16В



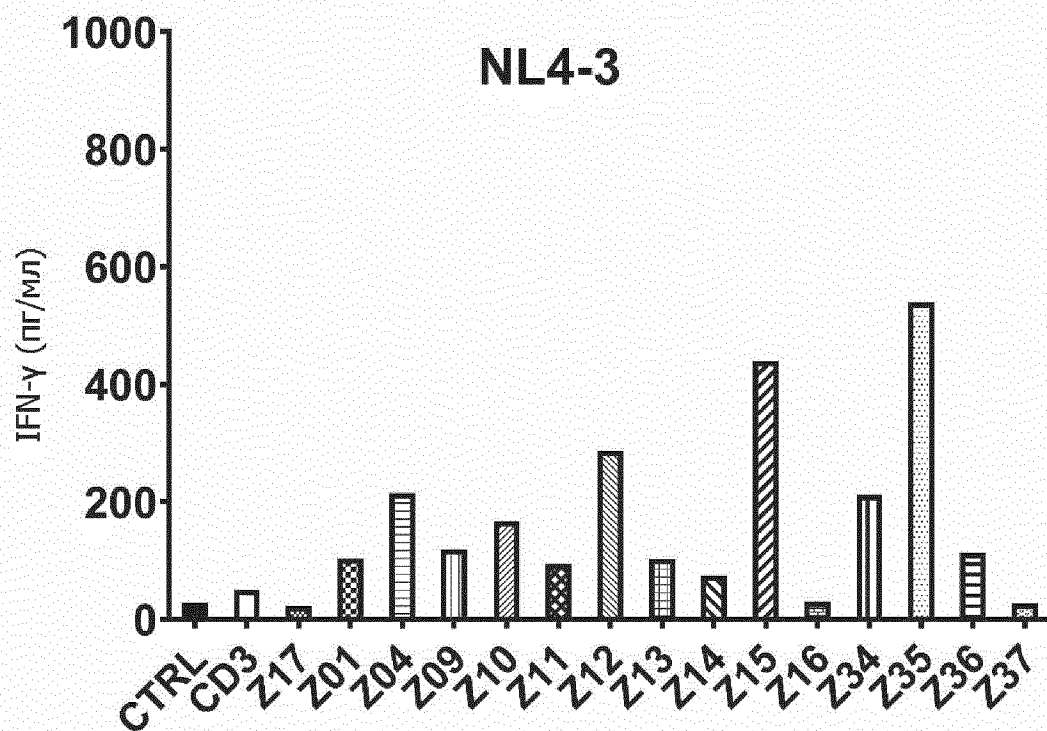
Фиг. 16С



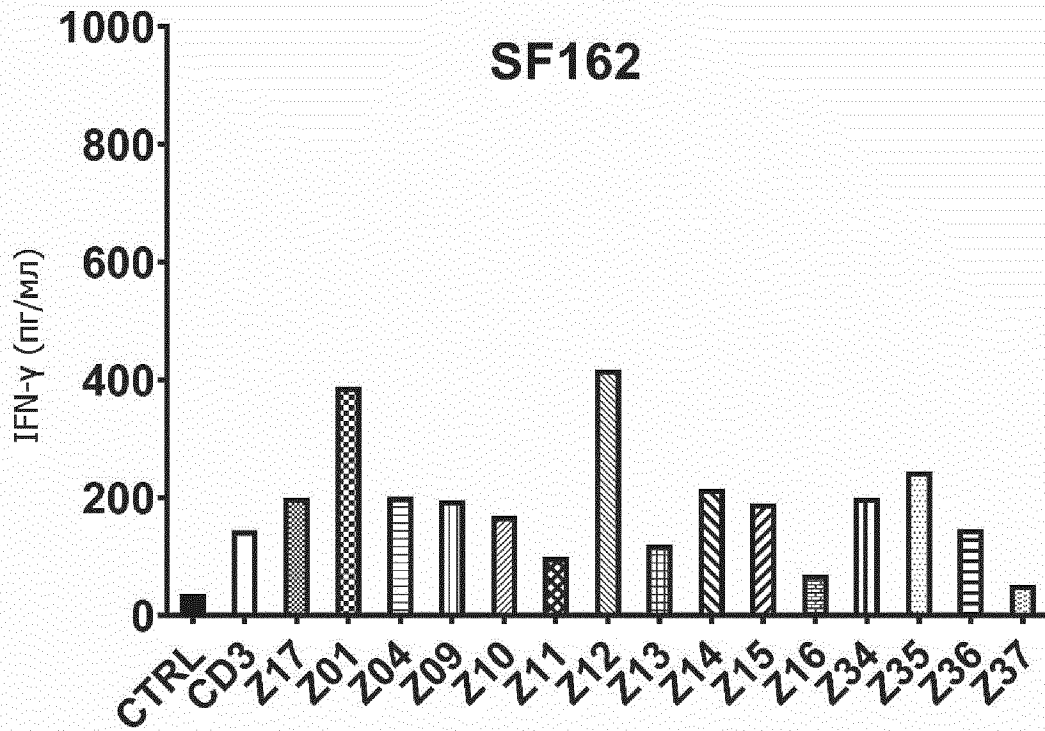
Фиг. 16D



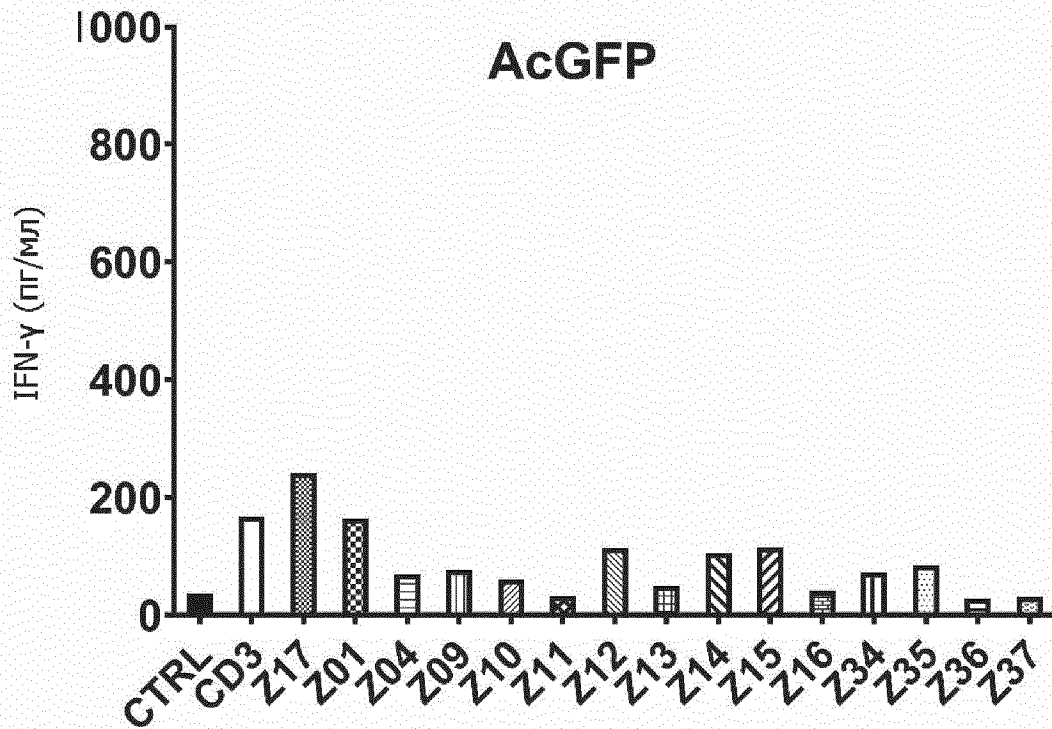
Фиг. 17А



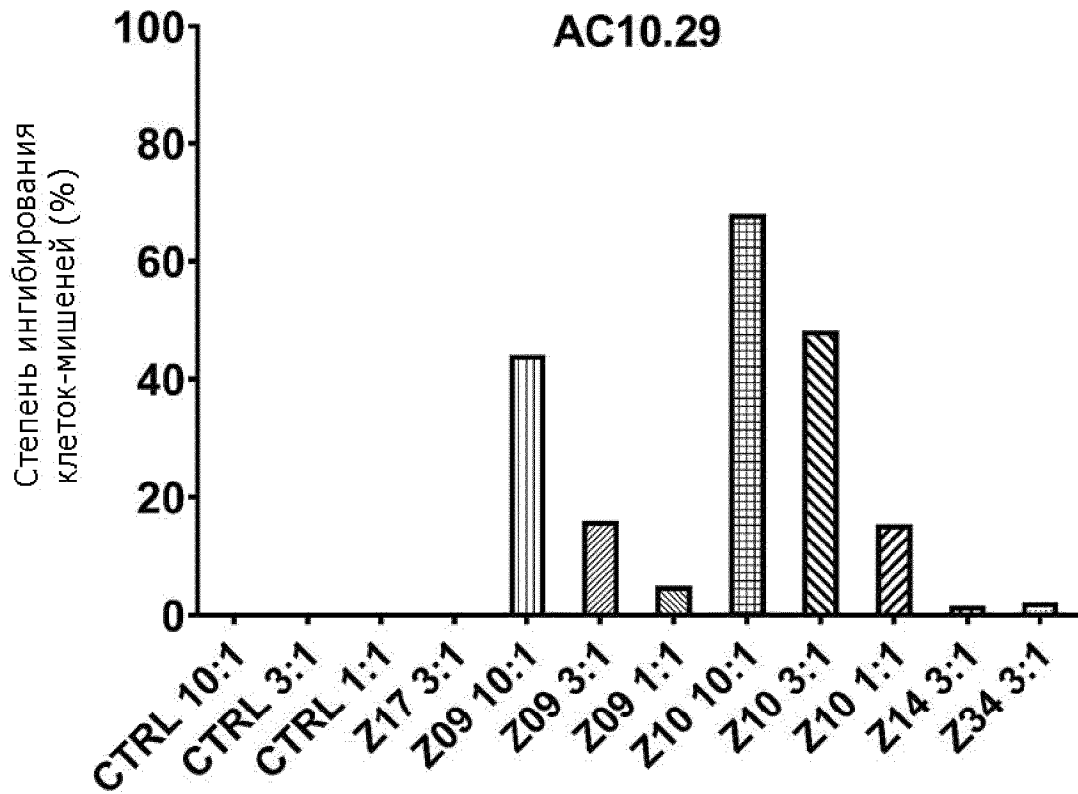
Фиг. 17В



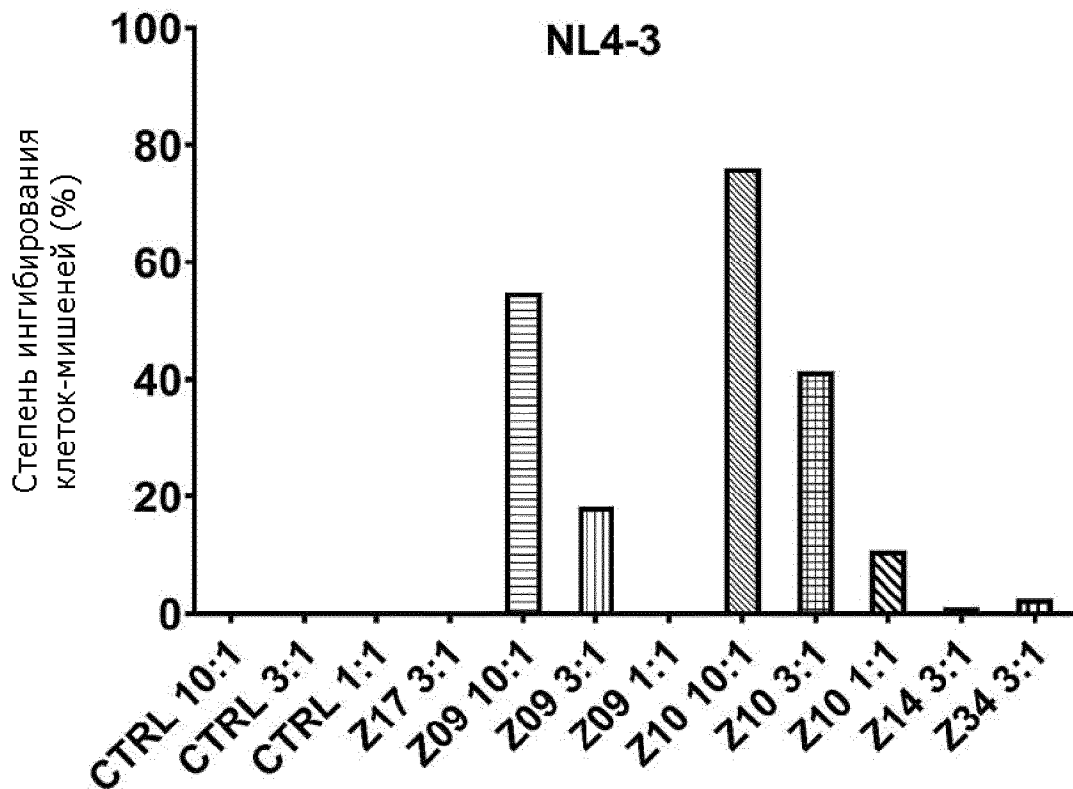
Фиг. 17С



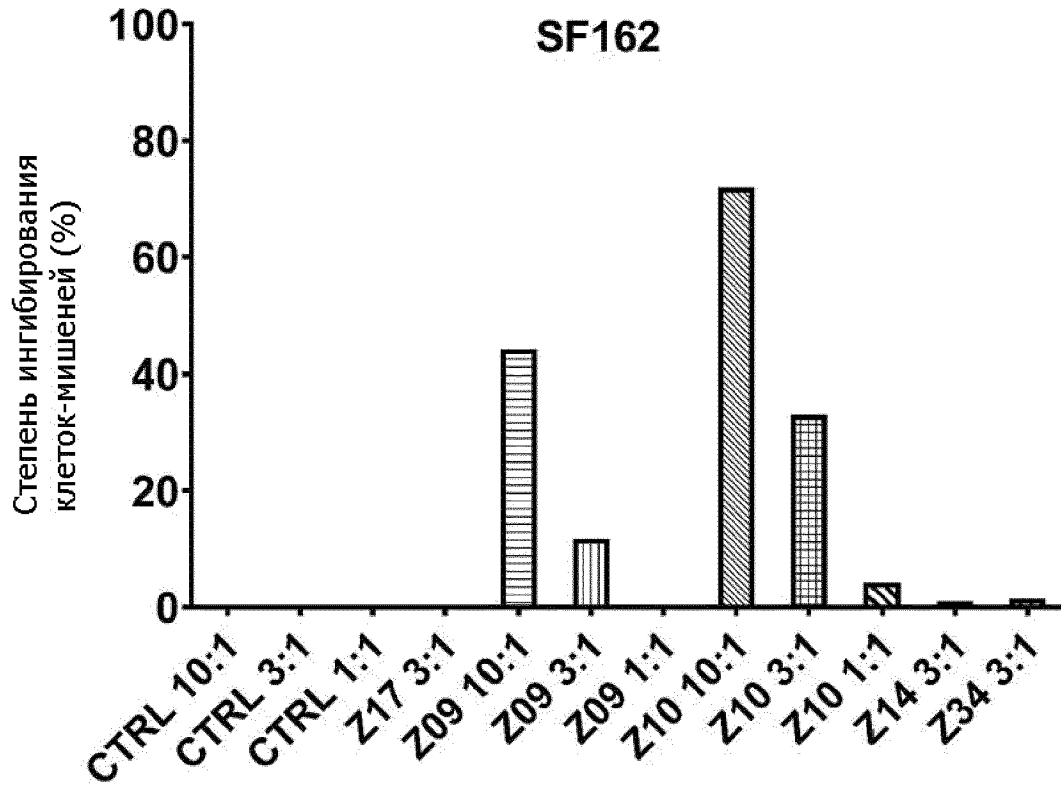
Фиг. 17D



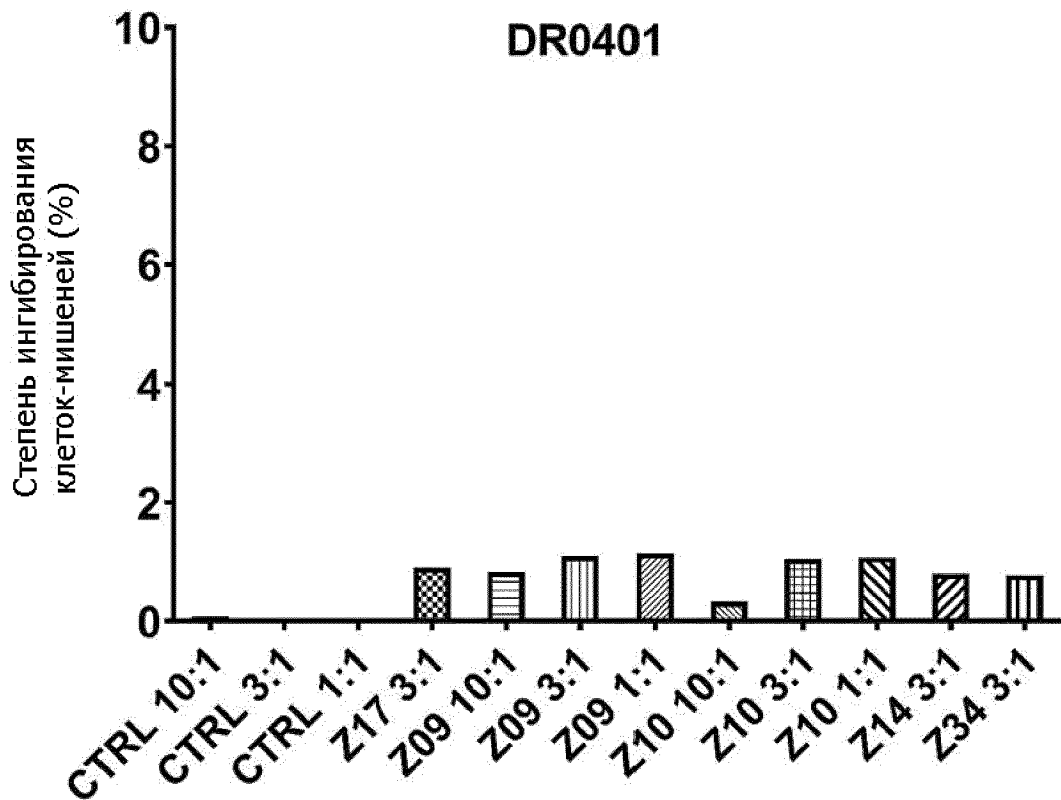
Фиг. 18А



Фиг. 18В

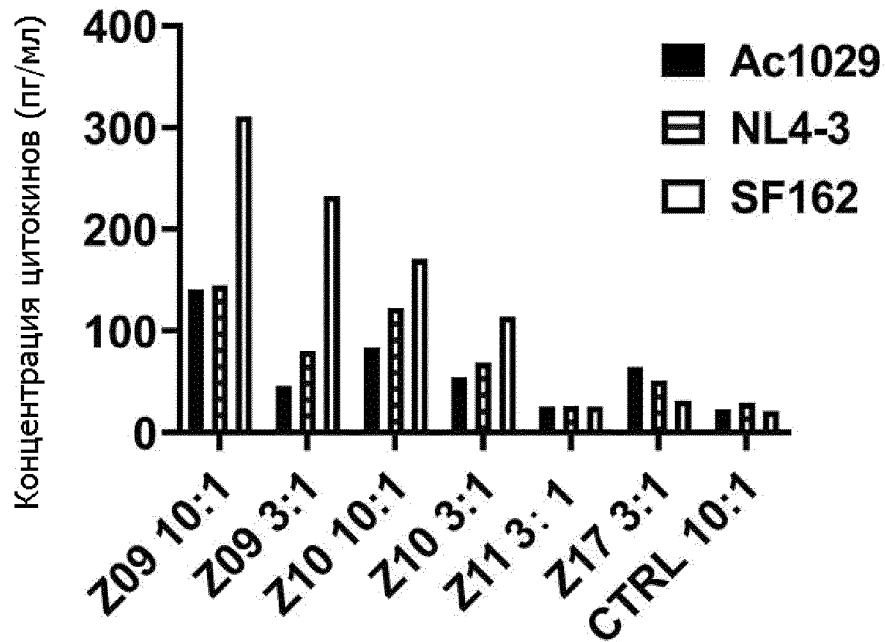


Фиг. 18С



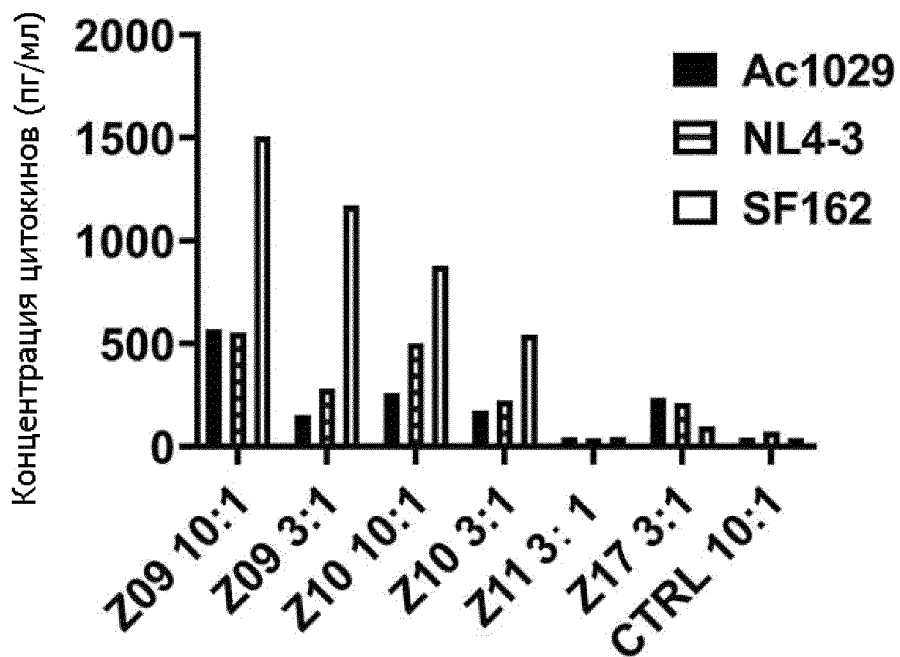
Фиг. 18D

CCL3/MIP-1 альфа



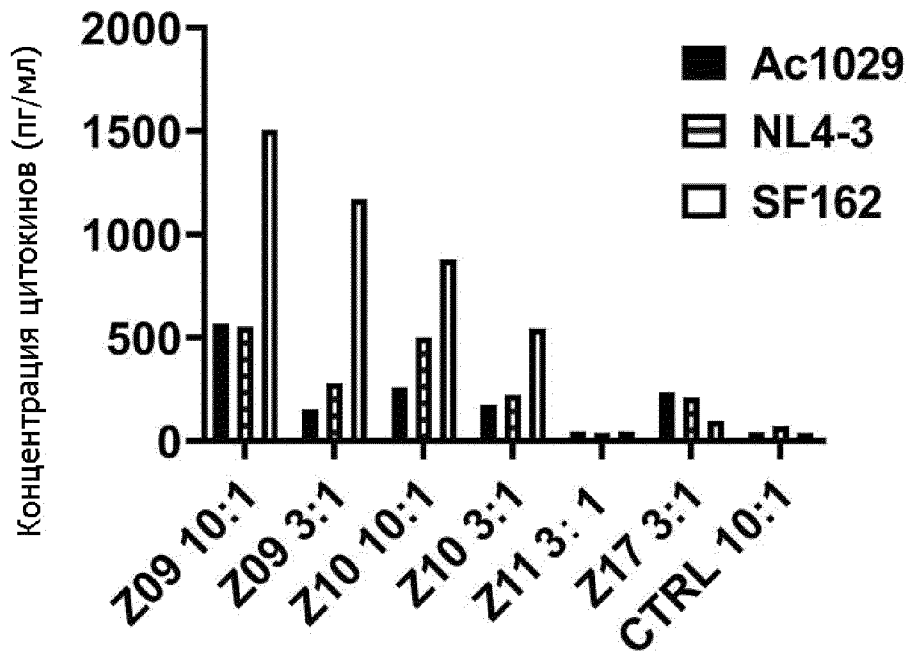
Фиг. 19А

CCL4/MIP-1 бета



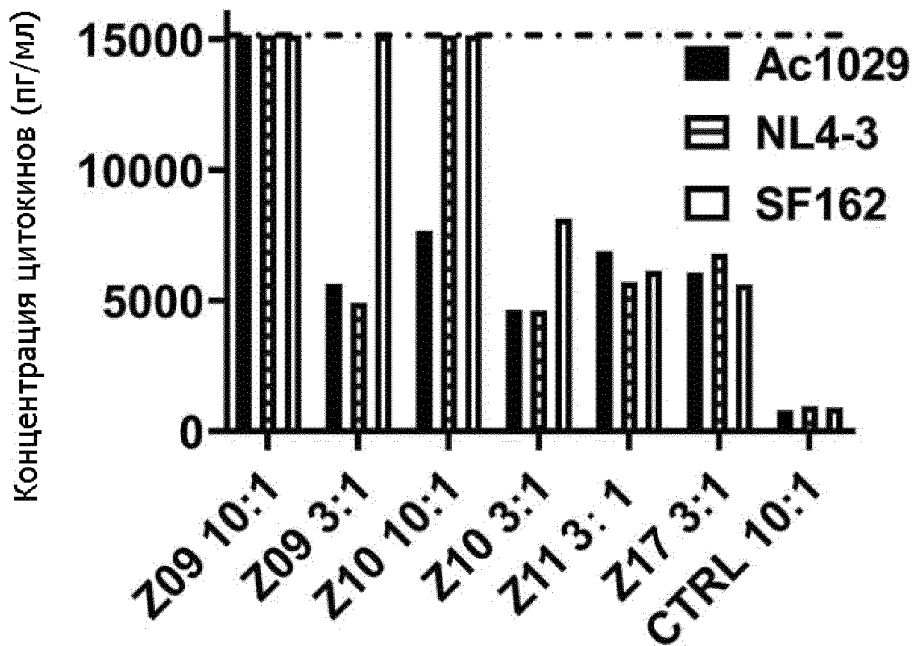
Фиг. 19В

GM-CSF

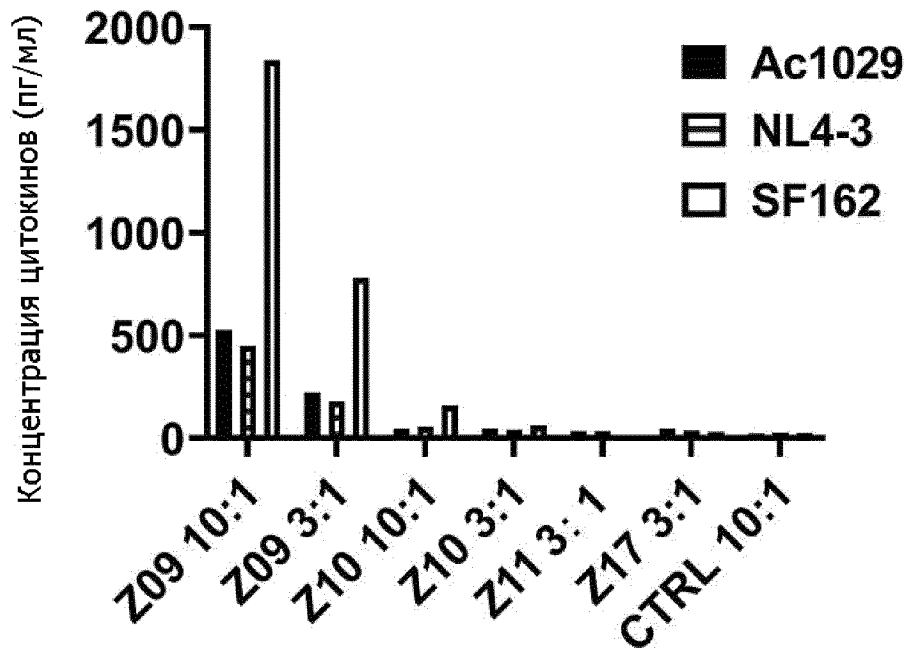


ФИГ. 19С

Гранзим В

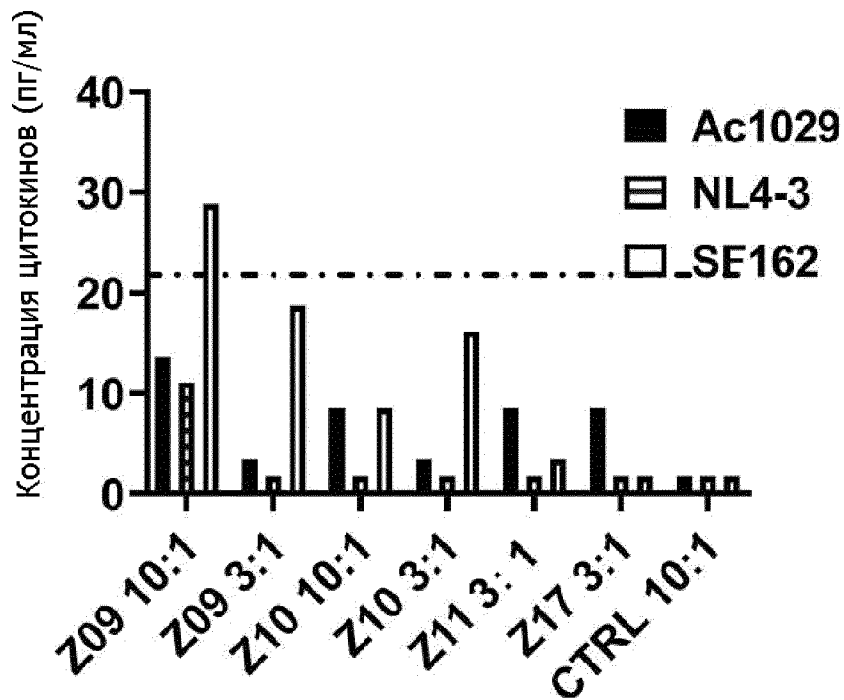


ФИГ. 19D

IFN- γ 

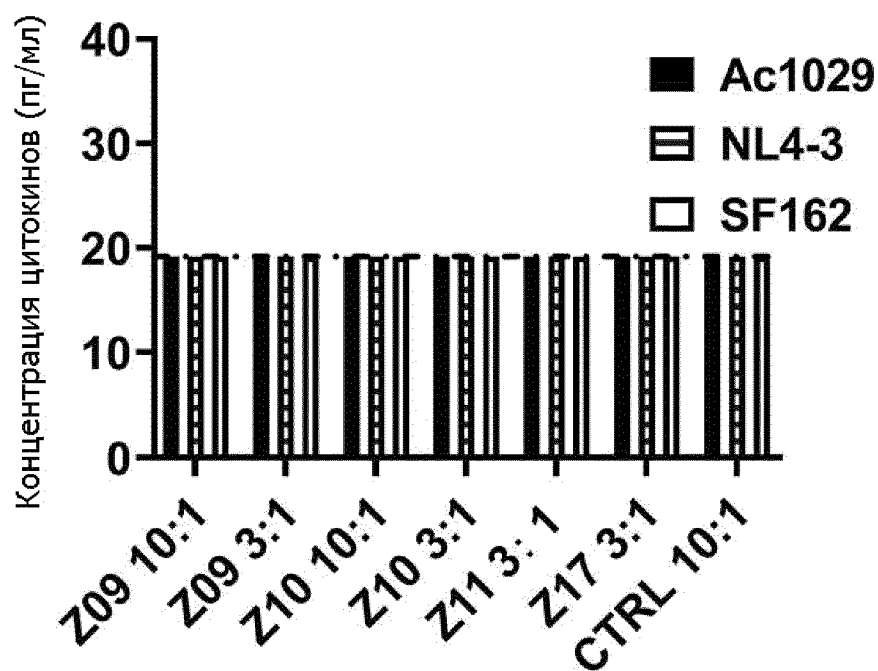
Фиг. 19Е

IL-10



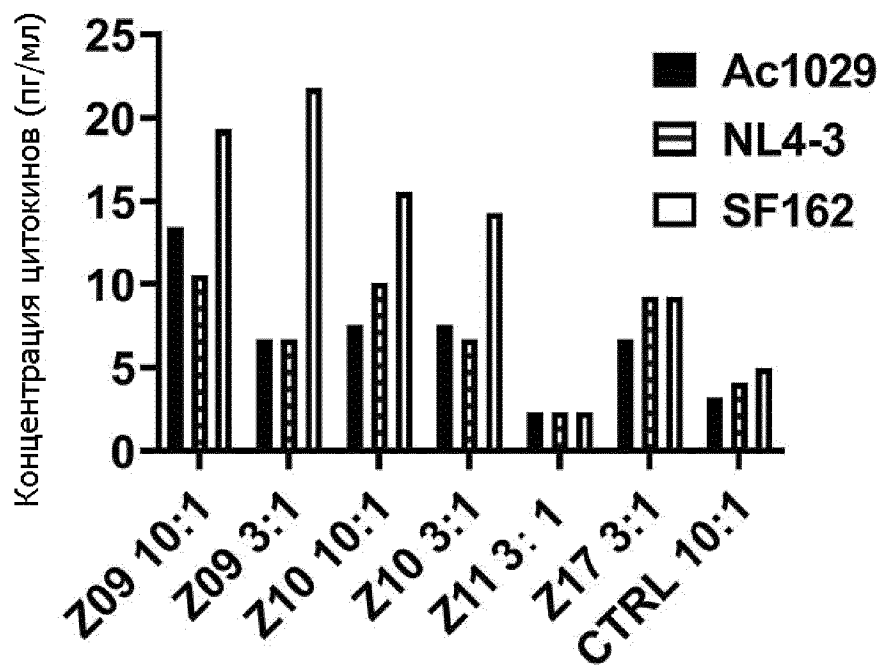
Фиг. 19F

IL-13



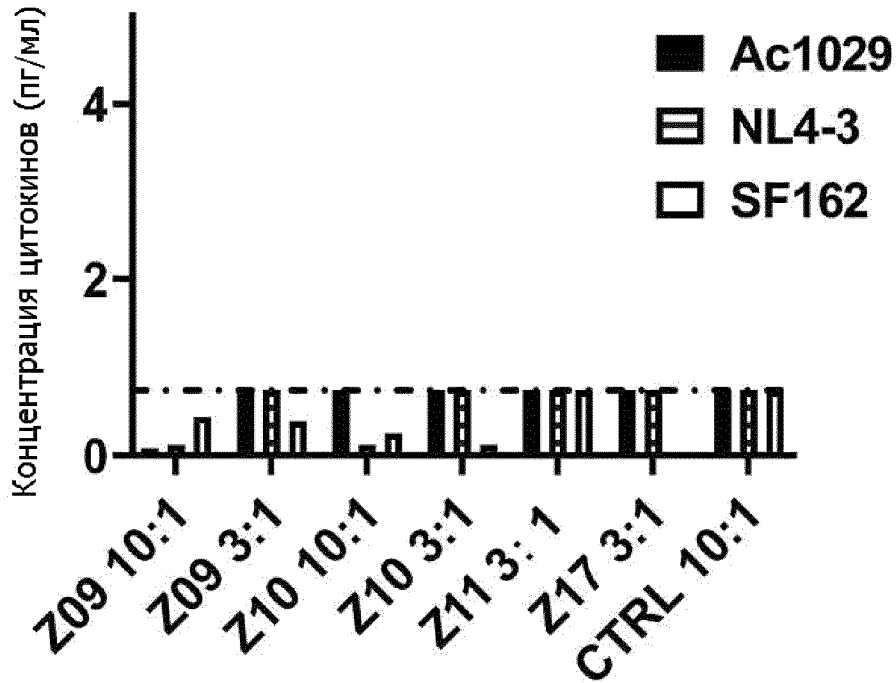
Фиг. 19G

IL-2



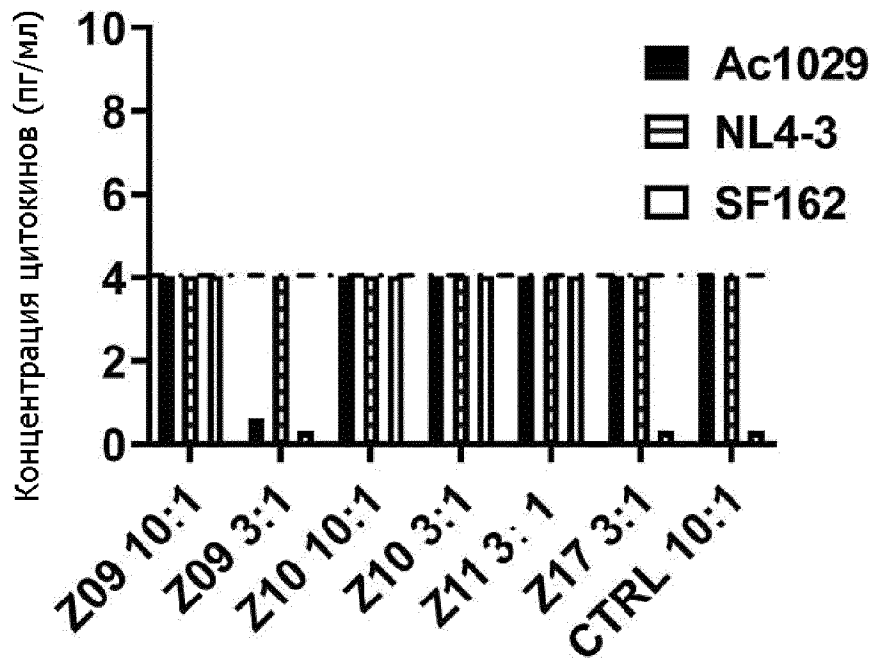
Фиг. 19H

IL-4



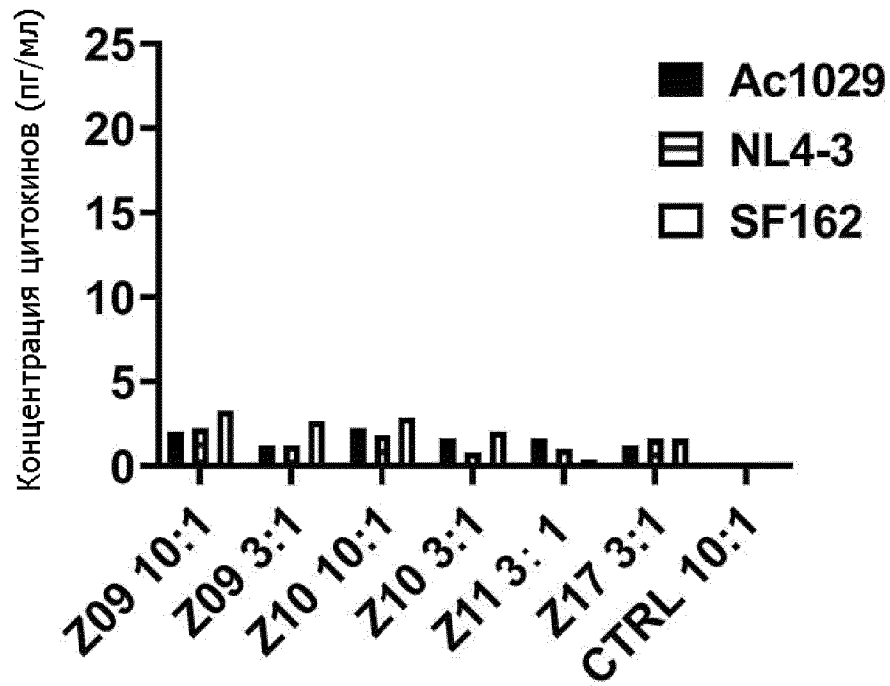
ФИГ. 19I

IL-5

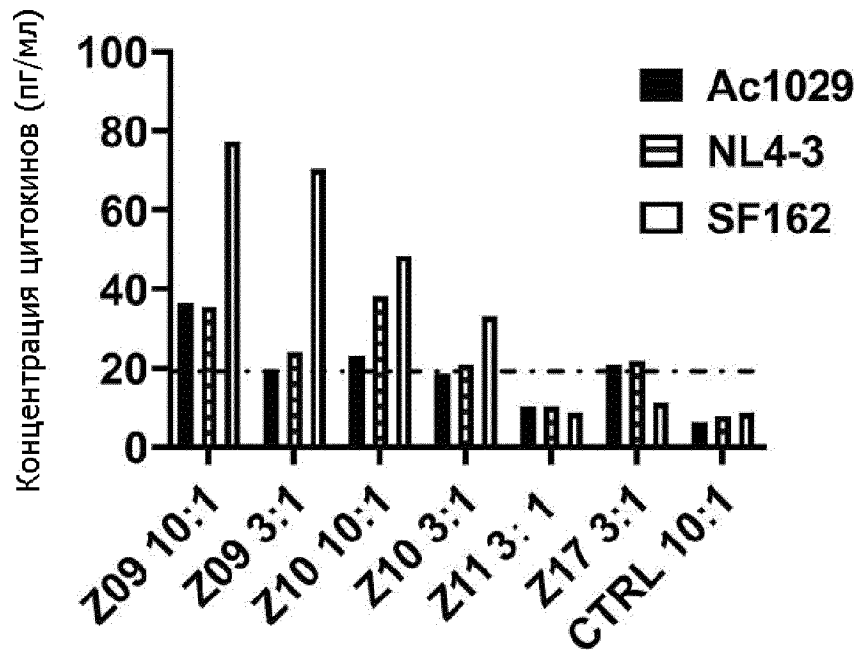


ФИГ. 19J

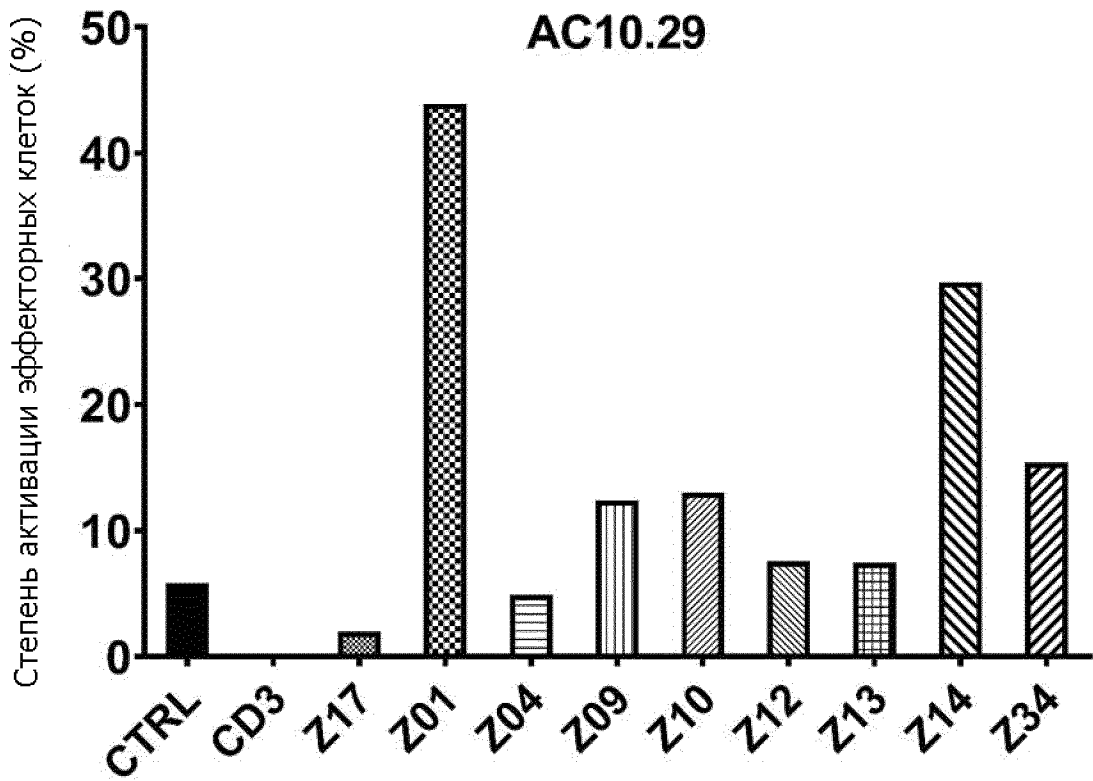
IL-6



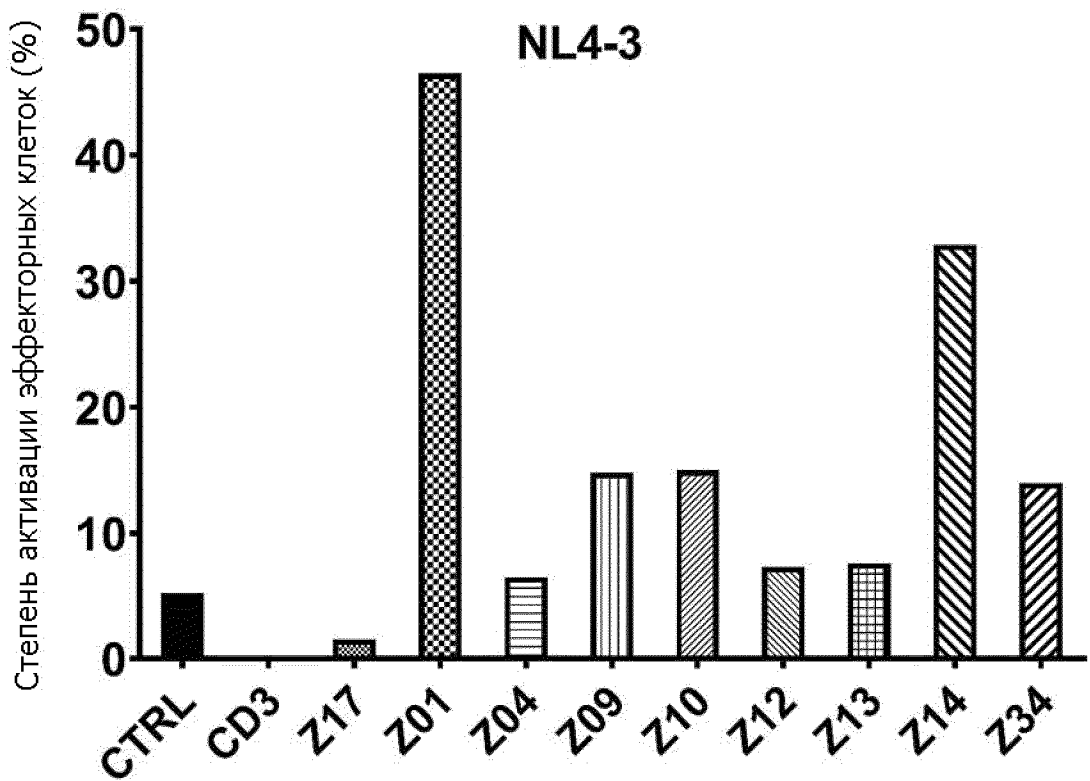
Фиг. 19К

TNF- α 

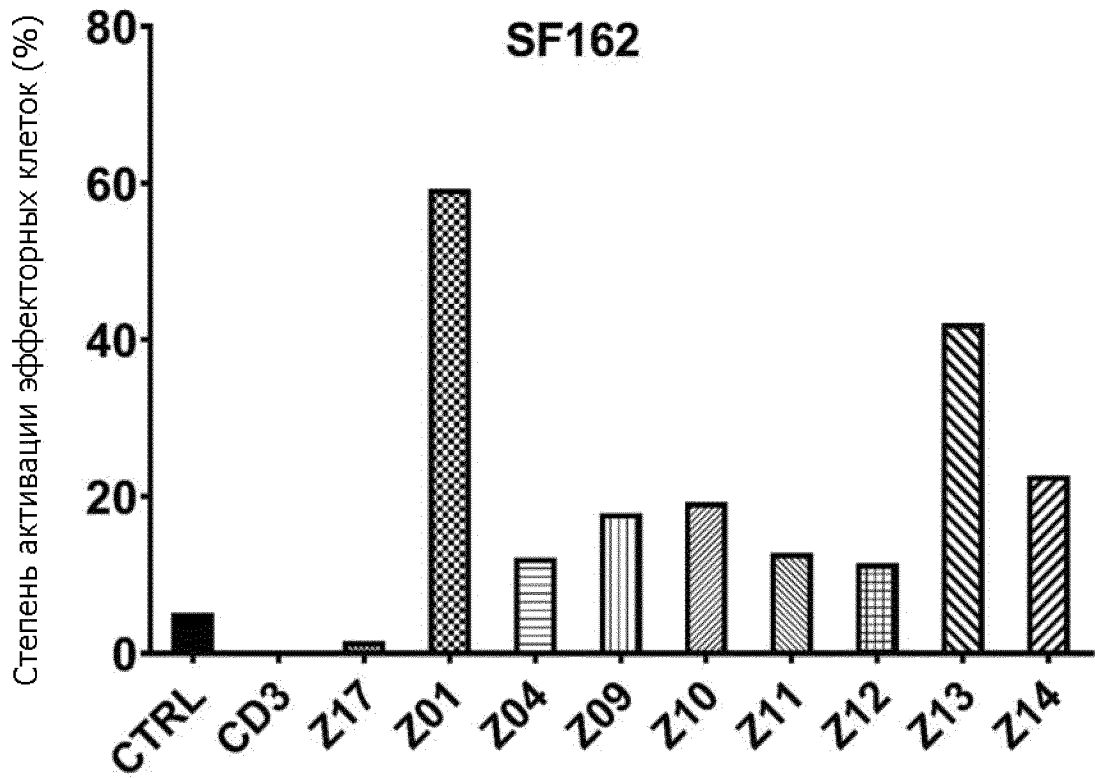
Фиг. 19L



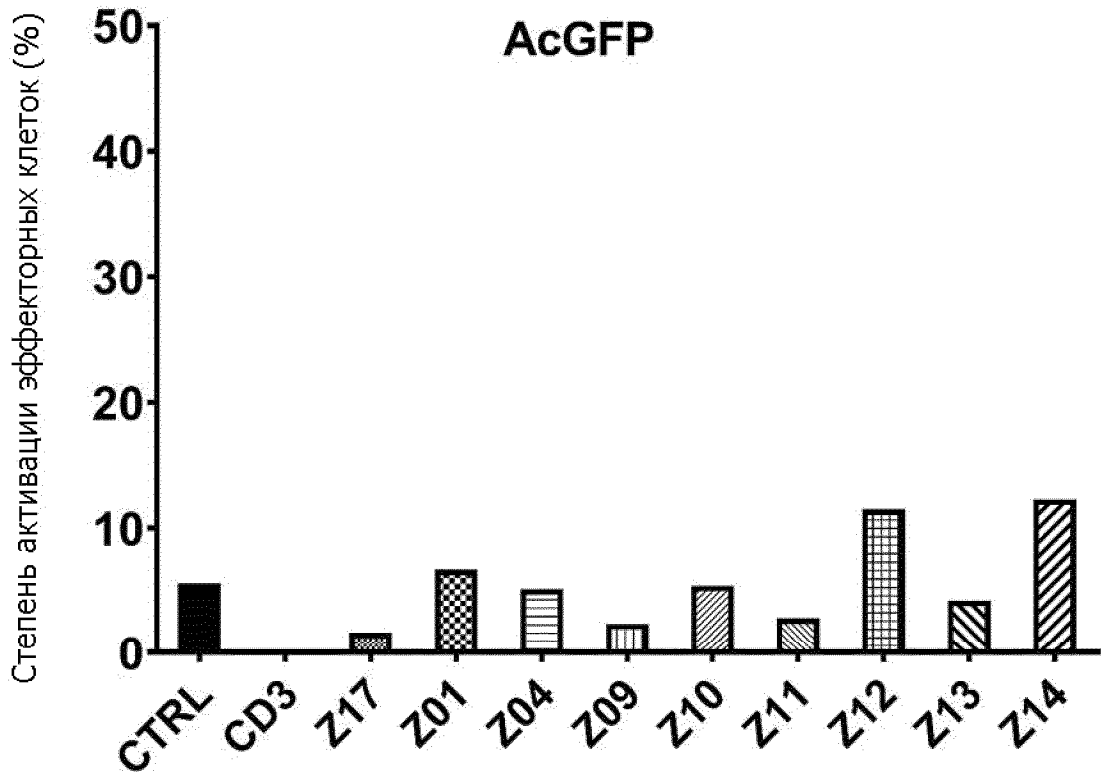
Фиг. 20А



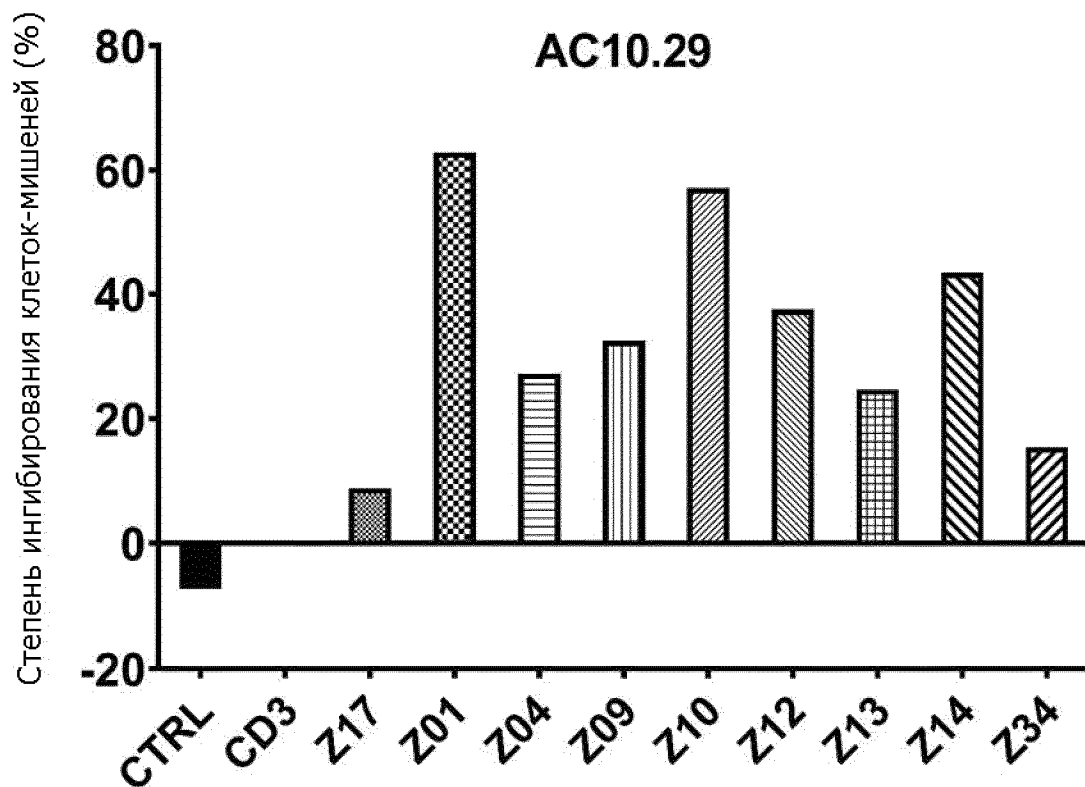
Фиг. 20В



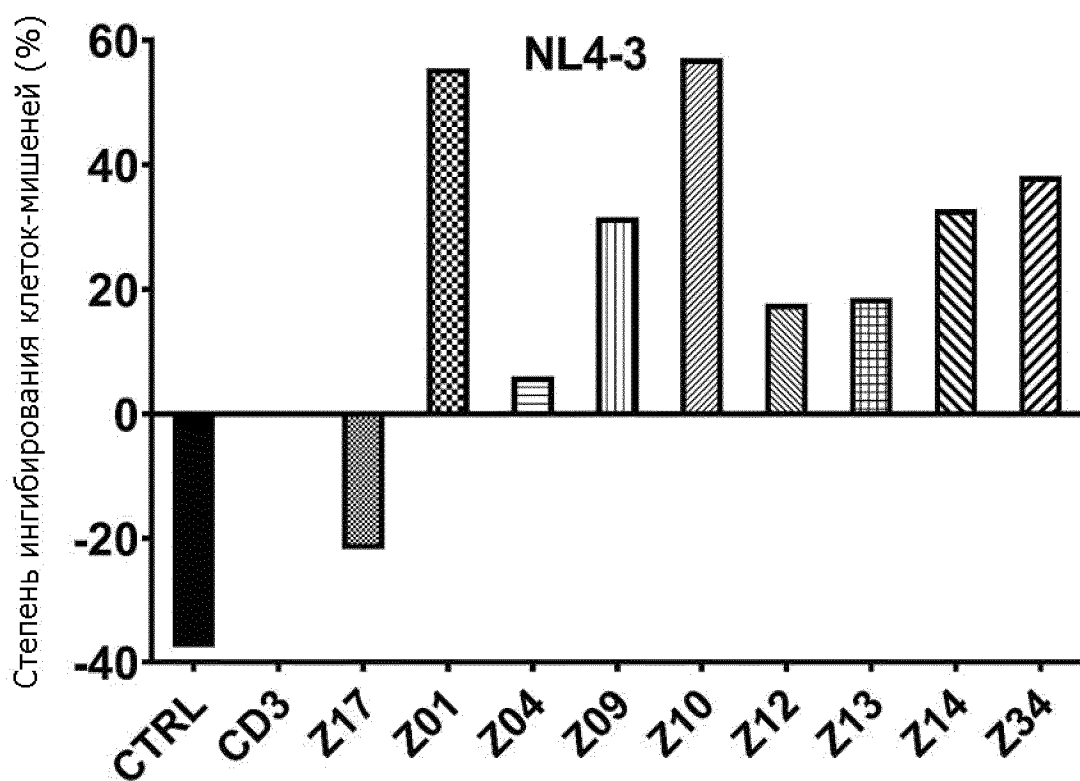
Фиг. 20C



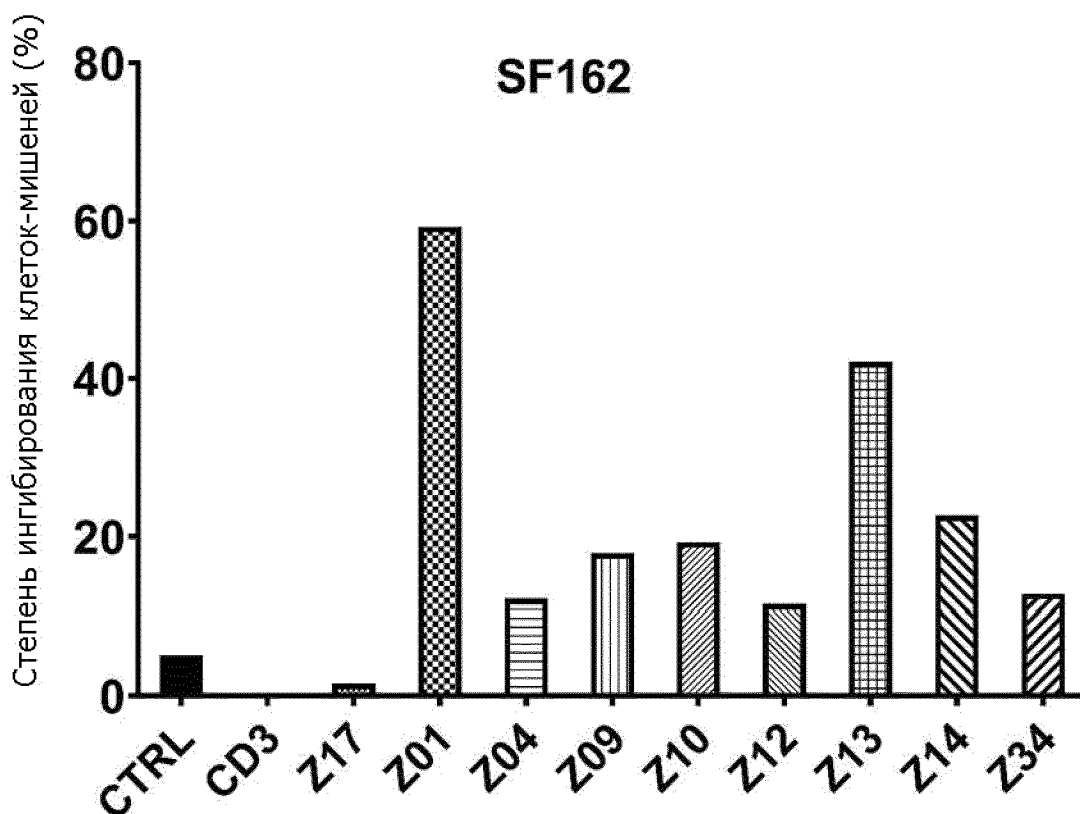
Фиг. 20D



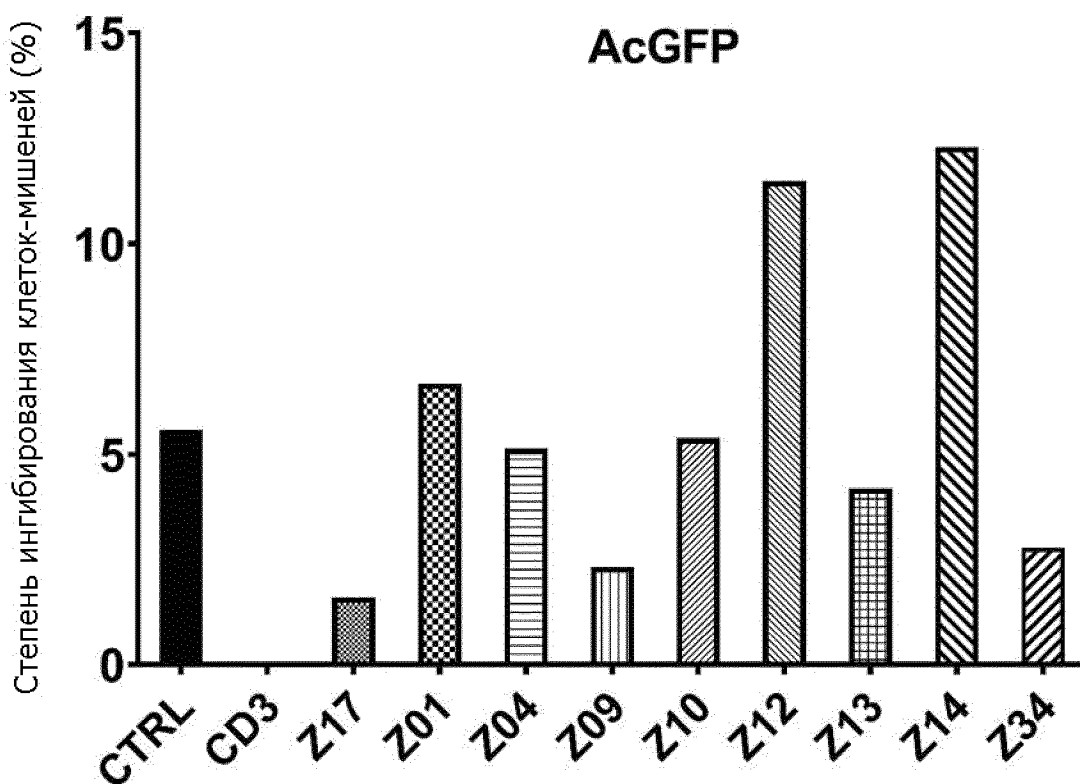
Фиг. 21А



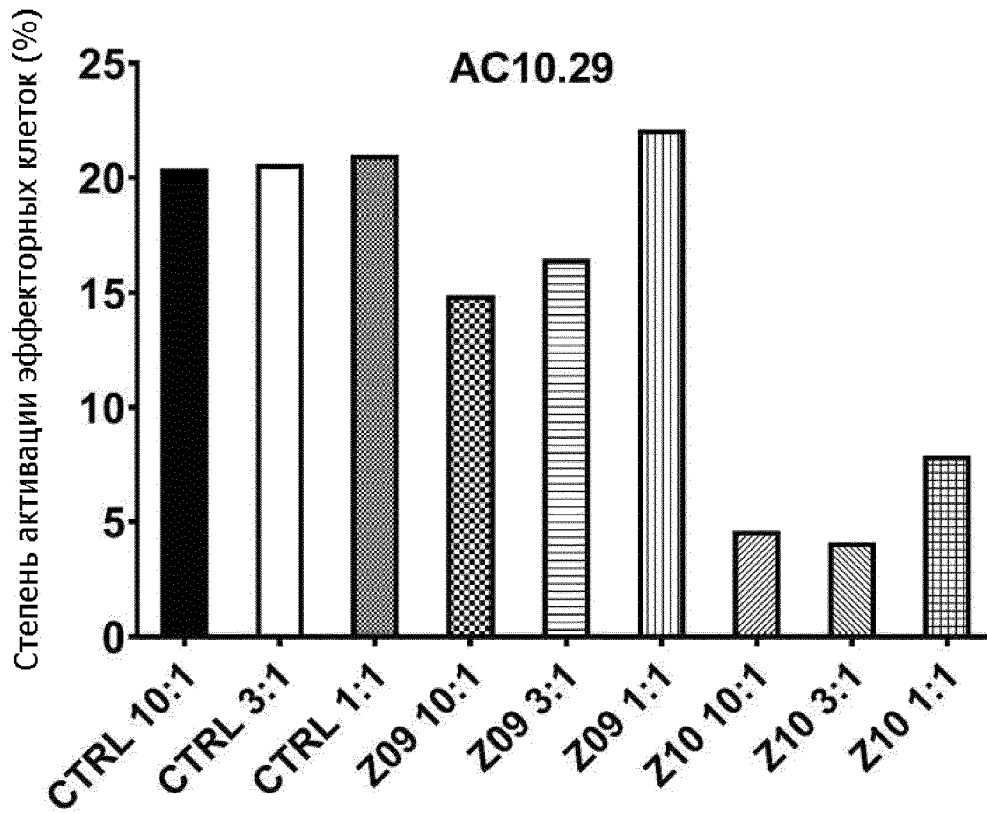
Фиг. 21В



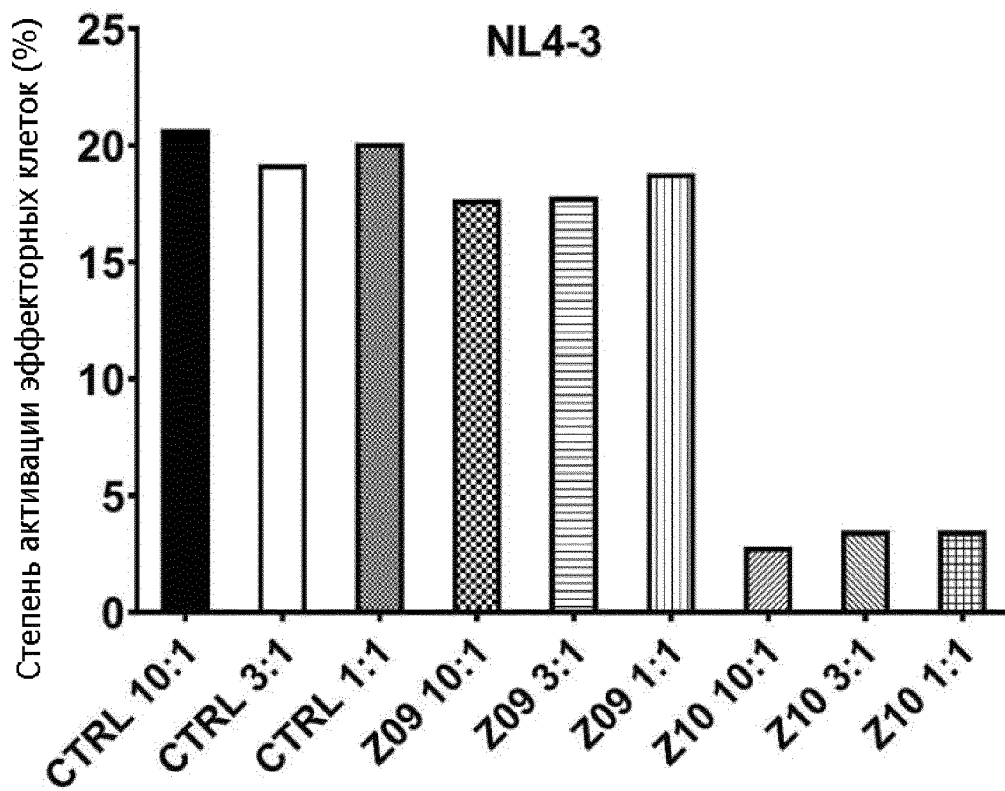
ФИГ. 21С



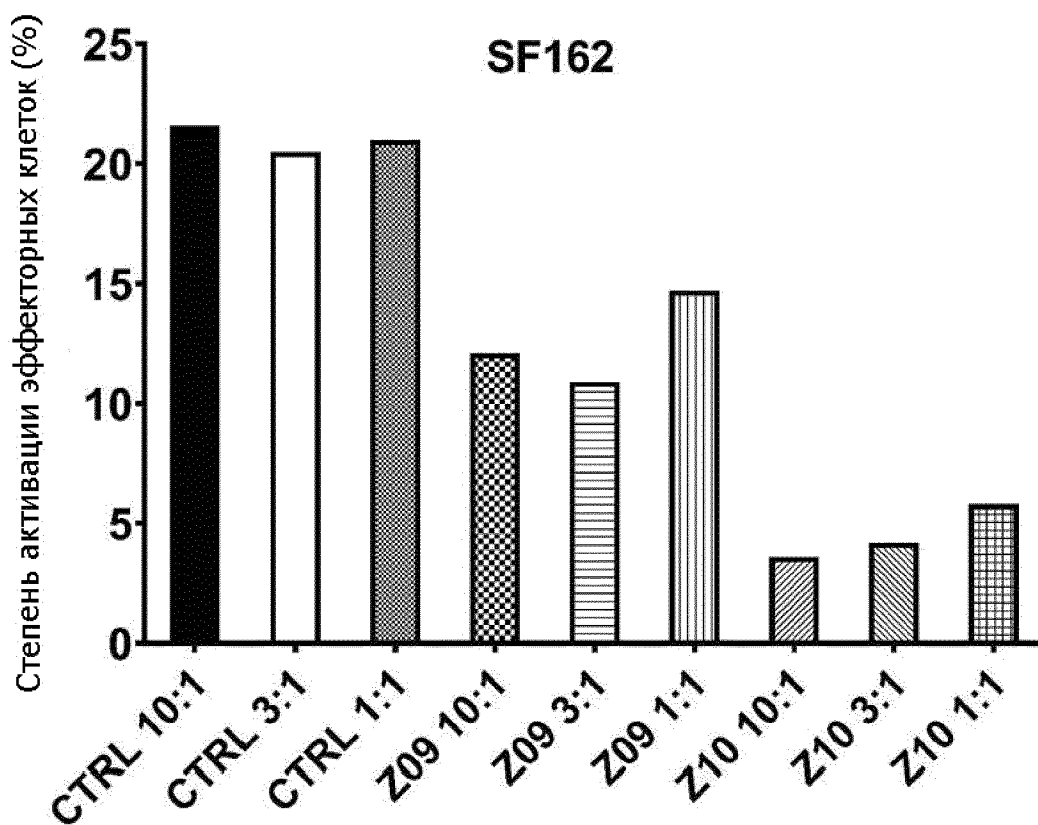
ФИГ. 21D



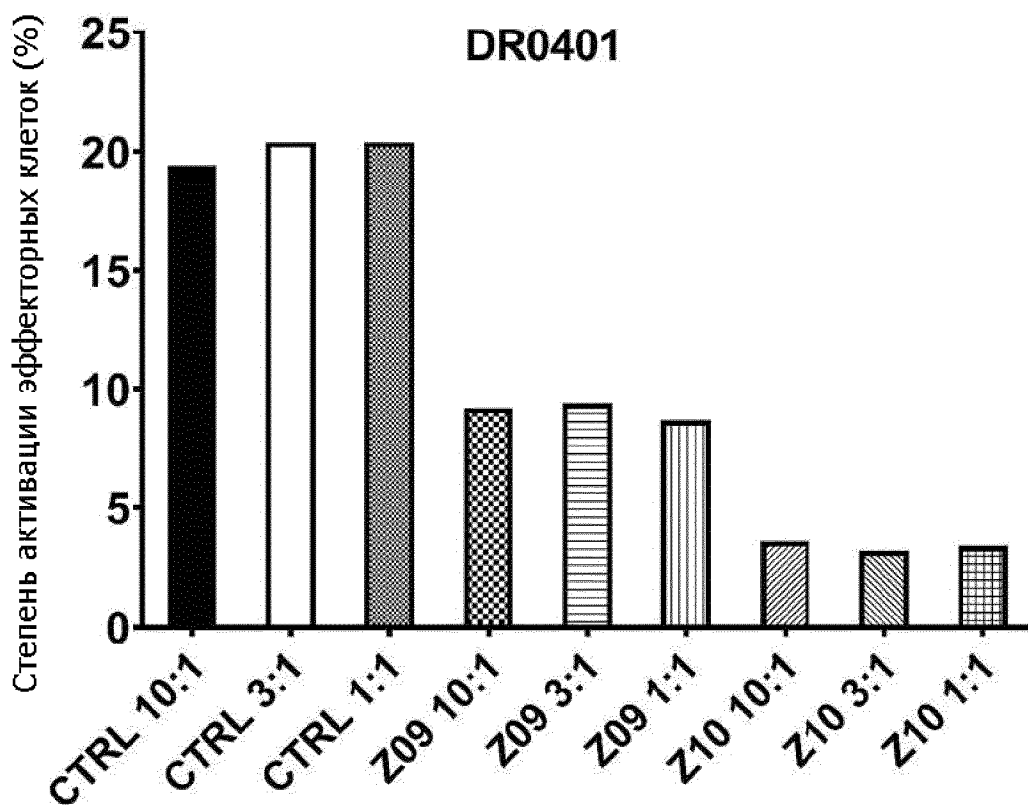
Фиг. 22А



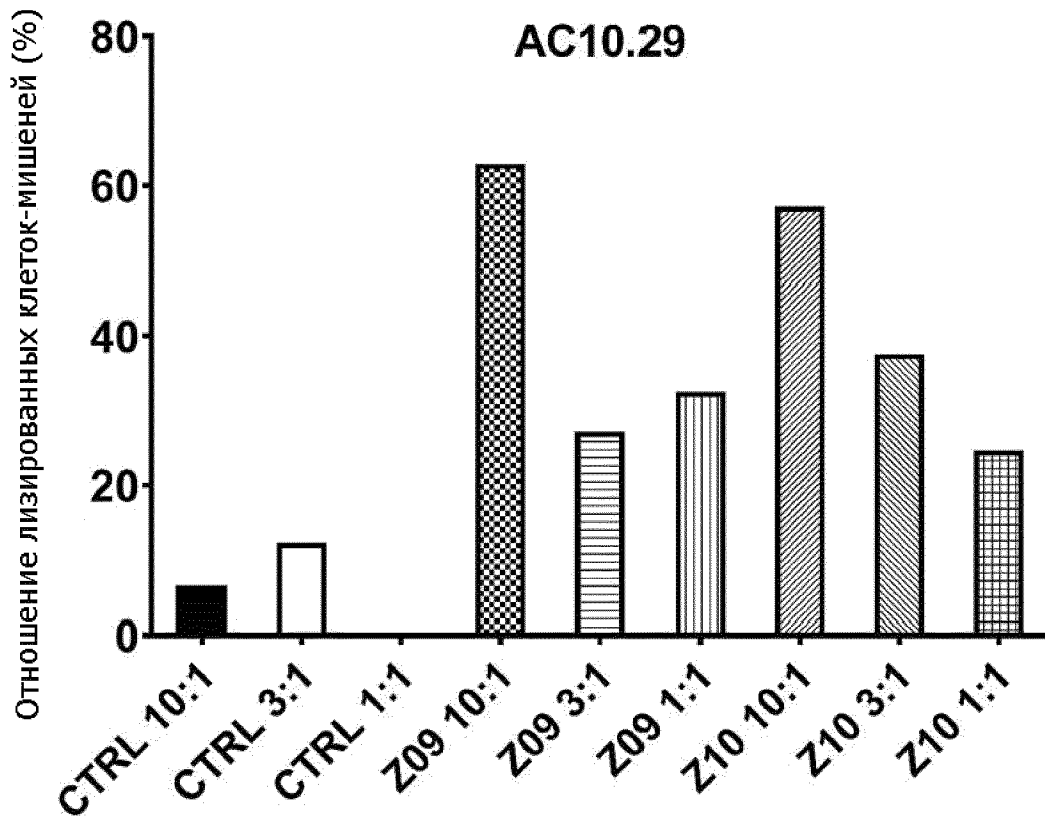
Фиг. 22В



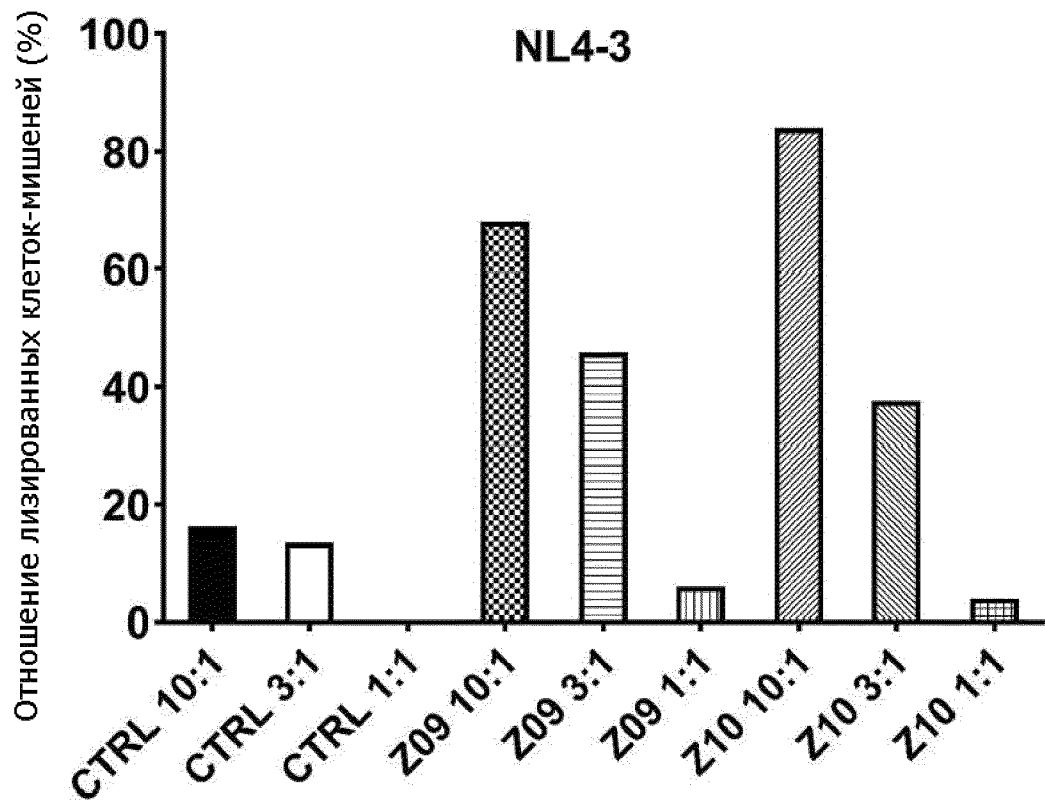
Фиг. 22С



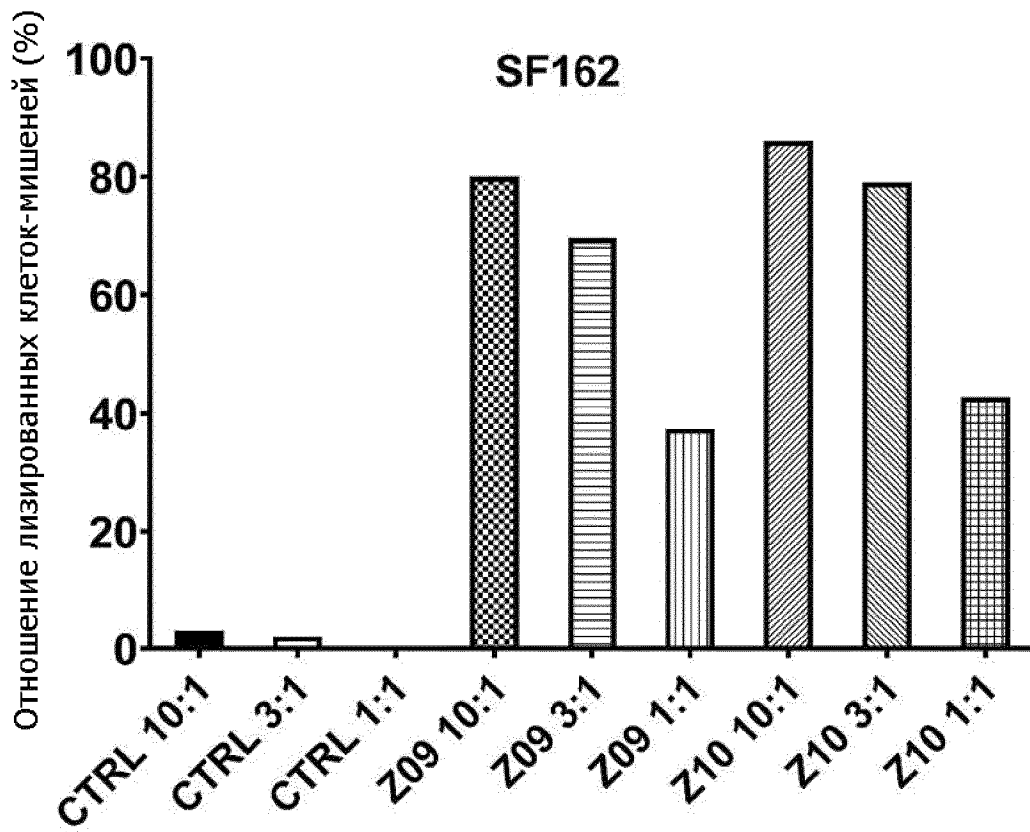
Фиг. 22D



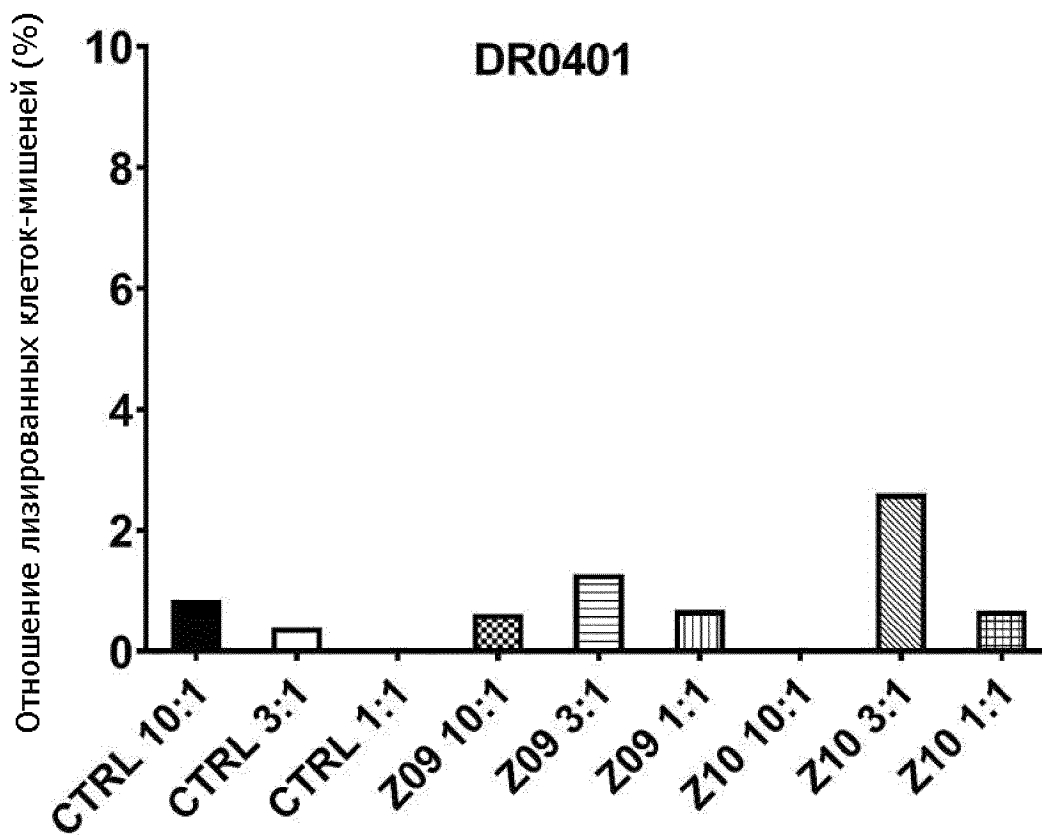
Фиг. 23А



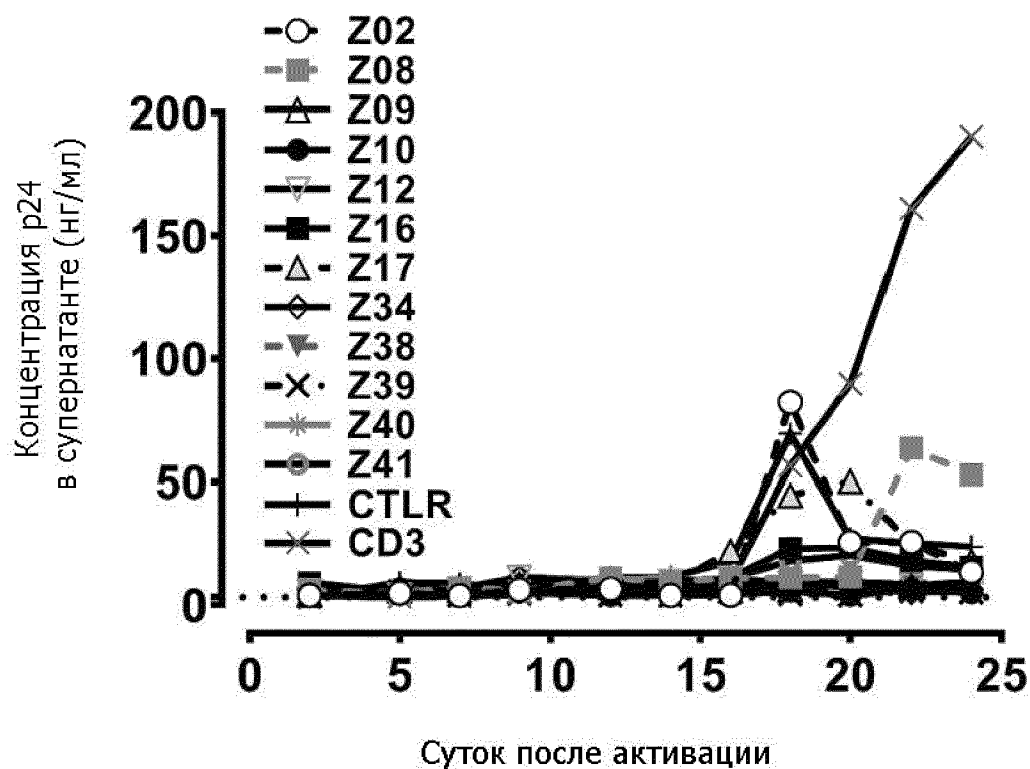
Фиг. 23В



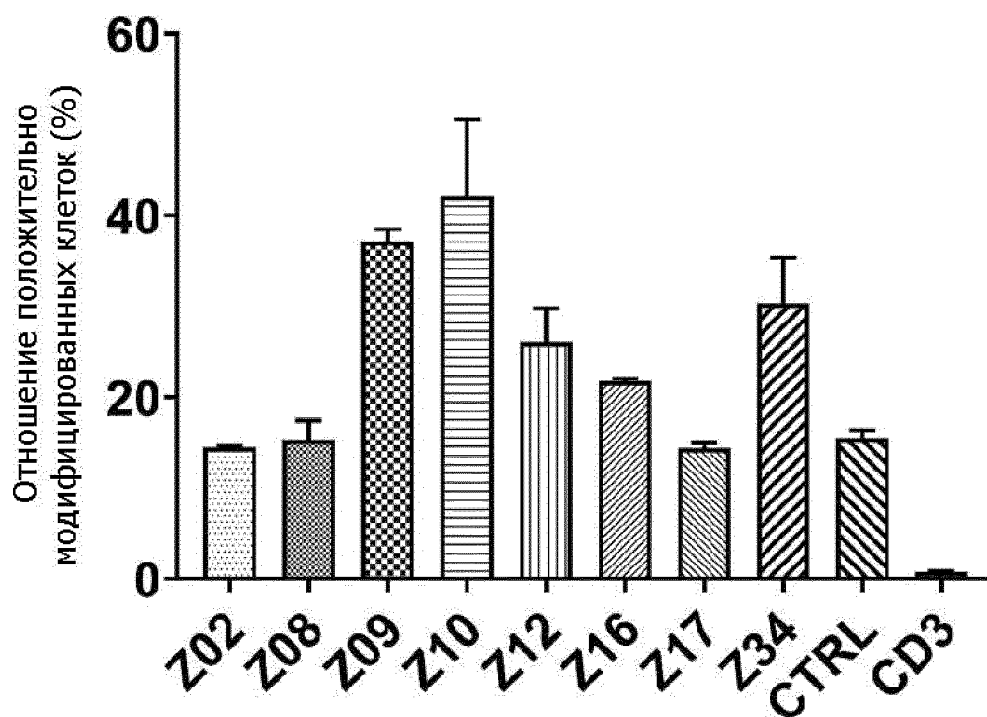
Фиг. 23С



Фиг. 23D



Фиг. 24А



Фиг. 24В