

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043051**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.04.20**

(21) Номер заявки  
**201892326**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.04.14**

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 14/725** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПРОГРАММИРОВАНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОНОСИТЕЛЕЙ НАПРАВЛЕННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

---

(31) **62/322,581; 62/442,890**

(32) **2016.04.14; 2017.01.05**

(33) **US**

(43) **2019.03.29**

(86) **PCT/US2017/027767**

(87) **WO 2017/181110 2017.10.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ФРЕД ХАТЧИНСОН КЭНСЕР  
СЕНТЕР (US)**

(72) Изобретатель:  
**Стефан Маттиас, Моффетт Хауэлл Ф.  
(US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A1-2014153114  
US-A1-20120192298  
US-A1-20040071654  
WO-A1-2014191527  
US-A1-20140309177  
US-A-8440431**

---

(57) Описаны композиции и способы, которые позволяют быстро и избирательно модифицировать гематопозитические стволовые клетки (или клетки, получаемые из них), чтобы достигать терапевтических целей, обеспечивая временную экспрессию нуклеиновых кислот. Временная экспрессия ведет к постоянным терапевтическим изменениям в модифицированных клетках, обозначаемым в настоящем описании как эффекты "наскок-отход".

---

**B1**

**043051**

**043051  
B1**

### **Перекрестные ссылки на связанные заявки**

По данной заявке испрашивают приоритет предварительной патентной заявки США № 62/442,890, поданной 5 января 2017 года, и предварительной патентной заявки США № 62/322,581, поданной 14 апреля 2016 года, полное содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

### **Область раскрытия**

Настоящее раскрытие предусматривает композиции и способы, которые быстро и избирательно модифицируют гематопозитические стволовые клетки (или клетки, получаемые из них), чтобы достигать терапевтических целей посредством обеспечения временной экспрессии нуклеиновых кислот. Временная экспрессия ведет к постоянным терапевтическим изменениям в модифицированных клетках, обозначаемым в настоящем описании как эффекты "наскок-отход". Способы можно воплощать на практике в культивируемых клетках или *in situ*.

### **Предпосылки раскрытия**

Успешная генетическая терапия зависит от механизмов успешной доставки гена в выбранные клетки, представляющие интерес. В настоящее время вирусные системы, такие как те, в которых используют лентивирусные векторы, представляют собой наиболее распространенный путь для достижения длительной генетической терапии. Эта генетическая терапия основана на текущей клеточной экспрессии белков терапевтического значения. Хотя такие вирусные системы позволяют эффективно доставлять гены для генетической терапии, они являются неизбирательными, дорогостоящими и не широко доступными. Кроме того, продолжительная экспрессия терапевтического белка может снижаться с течением времени из-за клеточных событий, которые наступают с течением времени.

Электропорация также разработана в качестве механизма доставки генов в клетки для генетической терапии. Однако электропорация основана на механическом разрушении и пермеабиллизации клеточных мембран, таким образом снижая жизнеспособность клеток, что делает их менее чем идеальными для терапевтического использования. Кроме того, подобно способам на основе вирусов, электропорация не избирательно доставляет гены в конкретные типы клеток из гетерогенного пула, так что этому должен предшествовать процесс отбора и очистки клеток.

### **Краткое изложение раскрытия**

Данное раскрытие предусматривает композиции и способы, которые быстро и избирательно модифицируют гематопозитические стволовые клетки (или клетки, получаемые из них) для достижения терапевтических целей посредством обеспечения временной экспрессии нуклеиновых кислот. Временная экспрессия ведет к постоянным терапевтическим изменениям в модифицированных клетках, обозначаемым в настоящем описании как эффекты "наскок-отход". Поскольку только временная экспрессия необходима для достижения длительного терапевтического эффекта, преодолены вопросы, связанные со снижением экспрессии терапевтического белка с течением времени. Кроме того, поскольку композиции и способы избирательно модифицируют выбранные типы клеток, перед модификацией не нужны процессы отбора или очистки клеток. Это ускоряет изготовление терапевтических клеток *ex vivo* и также делает возможной направленную генетическую модификацию клеток *in vivo*.

Эффекты наскок-отход, описанные в настоящем описании, допустимы благодаря использованию временной экспрессии нуклеиновых кислот, которая ведет к редактированию генов или временной экспрессии белков, которые перманентно изменяют фенотип клетки. Примеры нуклеиновых кислот, которые ведут к редактированию генов, включают TALEN, megaTALS, нуклеазы с цинковыми пальцами и системы CRISPR-Cas. Примеры изменяющих фенотип белков включают факторы транскрипции, киназы и рецепторы клеточной поверхности.

Существует множество применений для композиций и способов, раскрытых в настоящем описании. Примеры в культивируемых клетках включают редактирование генома гематопозитических клеток (включая гематопозитические стволовые клетки) с использованием направленных нуклеаз; импринтинг терапевтически желательного фенотипа в адоптивно перенесенных клетках посредством временной экспрессии определенного фактора транскрипции, снижение клеточного старения в адоптивно перенесенных клетках посредством экспрессии теломеразной обратной транскриптазы или антиапоптозных генов или изменение свойственного им клеточного тропизма через экспрессию хемокиновых рецепторов. Примеры *in situ* включают увеличение силы вакцин посредством совместной инъекции носителей, нагруженных нуклеиновыми кислотами, которые избирательно трансфицируют дендритные клетки для того, чтобы увеличивать их способность презентировать антигены; или трансфекцию Т-клеток, примированных вакциной, чтобы индуцировать долгоживущий фенотип памяти.

### **Краткое описание фигур**

Многие рисунки, поданные в настоящем описании, легче понять в цвете, что не доступно в публикациях патентных заявок на момент подачи. Заявители рассматривают цветные версии рисунков как часть исходно поданных материалов и сохраняют право предоставить цветные изображения рисунков при последующем производстве.

Фиг. 1А-С. Создание наночастиц мРНК для того, чтобы генетически программировать терапевтические Т-клетки (фиг. 1А). Схематическое объяснение того, как культивируемые Т-клетки можно про-

граммировать для того, чтобы экспрессировать терапевтически релевантные трансгены, которые несут полимерные наночастицы. Эти частицы покрывают лигандами, которые направляют их к конкретным типам клеток, что позволяет им вводить свой мРНК-груз и заставлять целевые клетки экспрессировать выбранные белки (такие как факторы транскрипции или средства редактирования генома) (фиг. 1В). Конструкция направленных мРНК-несущих наночастиц. На врезке представлен снимок репрезентативной наночастицы под трансмиссионным электронным микроскопом; масштабная полоска 50 нм. Также изображена синтетическая мРНК, инкапсулированная в наночастицу. Фиг. 1С. Примеры средств редактирования генов, изменяющих фенотип белков, целевых генов и их использований, которые можно использовать в вариантах осуществления, раскрытых в настоящем описании.

Фиг. 2. Антитела для проточной цитометрии.

Фиг. 3А-С. Физические свойства нагруженных мРНК наночастиц (фиг. 3А). Распределение размеров индивидуальных частиц с корректировкой по конечной длине пути (фиг. 3В). Трансмиссионная электронная микроскопия одной наночастицы (слева, масштабная полоска=100 нм) и популяции наночастиц (справа, масштабная полоска=2 мкм) (фиг. 3С). Дзета-потенциал контрольных наночастиц (-PGA-Ab) по сравнению с теми, которые покрывали PGA, сопряженным с антителами (+PGA-Ab), который измеряли после их разведения 1:40 в PBS pH 7,4 (n=5).

Фиг. 4А-Д. Трансфекция мРНК наночастиц требует минимальных манипуляций с клеткой и координирует надежную экспрессию трансгена лимфоцитами, не оказывая влияния на их жизнеспособность (фиг. 4А). Первичные Т-клетки смешивали с CD3-направленными полимерными наночастицами, несущими Су5-меченную мРНК. С помощью конфокальной микроскопии установлено, что эти частицы быстро подвергаются интернализации с клеточной поверхности. Изображения репрезентативны для 15 случайно выбранных полей (фиг. 4В). Проточная цитометрия Т-клеток через 24 ч после инкубации с CD3-направленными наночастицами, несущими eGFP-кодирующую мРНК (фиг. 4С, фиг. 4Д). Сравнение эффектов электропорации и доставки гена наночастицами, оказываемых на размножение клеток. Слева показаны последовательности операций для трансфекции наночастицами (сверху) и электропорации (снизу). Справа показана кратность размножения в культурах РВМС от трех независимых доноров, которых лечили стимулирующими бусами в сутки 0 и 12. Соответствующие культуры от каждого донора не обрабатывали или трансфицировали CD3/CD28-направленными наночастицами (фиг. 4С, справа) или через электропорацию (фиг. 4Д, слева) в сутки 5 и 12. Каждая линия представляет одного донора и каждая точка отражает кратность размножения Т-клеток. Парные различия между группами анализировали с использованием критерия Стьюдента; ns, не значимо; \*, значимо, n=3).

Фиг. 5А, В. Трансфекция наночастицами является быстрой, и лиофилизация не ухудшает ее (фиг. 5А). Экспрессия eGFP в  $10^6$  активированных Т-клеток, которые или не обрабатывали или измеряли через 5 ч после добавления eGFP-кодирующих NP, направленных с использованием средства против CD3 (фиг. 5В). Эффективность трансфекции NP сохраняется после лиофилизации и ресуспендирования.  $10^6$  активированных Т-клеток на условие трансфицировали с использованием NP (направленных с использованием антител против CD3 или против CD8), которые или получали свежими или лиофилизировали, хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  и затем суспендировали до их исходного объема.

Фиг. 6. Относительная жизнеспособность трансфицированных наночастицами и электропорированных Т-клеток. Образцы  $2 \times 10^6$  активированных Т-клеток на условие не обрабатывали, трансфицировали с использованием NP или электропорировали, как описано на фиг. 2С. Через 18 ч после обработки клетки метили флуоресцентными красителями для того, чтобы оценивать жизнеспособность. Результаты, приведенные здесь, репрезентативны для трех отдельных экспериментов.

Фиг. 7А-Н Наночастицы, несущие мРНК, кодирующую TCR $\alpha$ -направляющую нуклеазу megaTAL, могут осуществлять нокаут Т-клеточных рецепторов в CAR-запрограммированных лимфоцитах (фиг. 7А). Встраивание трансфекции наночастицами в нормальное изготовление CAR-Т-клеток. После стимуляции бусами с покрытием против CD3/CD28 (сутки 0), CD8-направленные мРНК NP вводили в сутки 1 и 2, затем осуществляли лентивирусную трансдукцию вектором, кодирующим лейкоз-специфический 19-41BB $\zeta$  CAR, в сутки 3. Отдельно добавляли или NP, несущие мРНК, кодирующую нуклеазу megaTAL плюс eGFP, или контрольные частицы, нагруженные мРНК eGFP (фиг. 7В). Проточная цитометрия эффективности NP трансфекции (на основании сигналов eGFP) коррелировала с уровнями поверхностной экспрессии TCR (на основании сигналов CD3) Т-клетками после обработки NP (фиг. 7С). Сводный график, показывающий эффективность редактирования, как измеряют по утрате поверхностной экспрессии CD3 в сутки 14 (n=5) (фиг. 7Д). Оценочный анализ, подтверждающий разрушение локуса гена цепи TCR $\alpha$ . (фиг. 7Е) Проточная цитометрия лентивирусной трансдукции в Т-клетках с отредактированным геномом в сравнении с контрольными Т-клетками (фиг. 7F). Пролиферация TCR $^+$  (контролей) и TCR $^-$  (обработанных mTAL NP) CAR-Т-клеток, которые совместно культивировали с облученными клетками ТМ-LCL лейкоза (фиг. 7G). Анализы цитотоксичности с лизисом целевых клеток CD19-K562 CAR-Т-клетками (фиг. 7H). Внутриклеточная экспрессия цитокинов IL-2 и IFN- $\gamma$  после стимуляции с использованием PMA и иономицина (P/I).

Фиг. 8А-F. Наночастицы с мРНК, кодирующей фактор транскрипции Foxo13A, индуцируют мар-

керы поверхности и транскрипционные паттерны, характерные для CD8<sup>+</sup> центральных Т-клеток памяти (фиг. 8А). Экспрессия общего белка Foxo1, измеряемая посредством внутриклеточного мечения в Jurkat и первичных Т-клетках, которые обрабатывали с использованием CD3-направленных контрольных (GFP<sup>+</sup>) или Foxo13A-GFP NP (фиг. 8В). qPCR измерения относительной экспрессии мРНК Foxo13A с течением времени после того, как клетки экспонировали для Foxo13A-eGFP NP. Эффект CD8-направленных Foxo13A-GFP NP, оказываемый на экспрессию CD62L, после 24 ч обработки частицами (фиг. 8D). Процентная доля CD62L<sup>+</sup> клеток в сортированных CD8<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> клетках, которые обрабатывали с использованием CD8-направленных контрольных или Foxo13A/eGFP-кодирующих NP в 1, 8 и 20 сутки культивирования после введения частиц. Это результаты от 3 независимых доноров. \*P<0,05; \*\*P<0,01 между указанными условиями, как вычисляют по парному критерию Стьюдента для соотношений (фиг. 8E). Тепловая карта сигнатурной экспрессии генов TCM в TCM, наивных и контрольных клетках в 8 сутки после обработки (фиг. 8F). Вулканная диаграмма дифференциальной экспрессии генов в обработанных Foxo13A NP клетках после суток 8. Указаны геновая сигнатура TCM и выбранные гены фенотипа памяти. Р-значение перекрытия между Foxo13A и сигнатурным набором генов TCM определяли с помощью GSEA (через анализ, приведенный на фиг. 9В).

Фиг. 9А, В. Обогащение набора генов обнаруживает сильные корреляции между TCM и обработанными Foxo13A наночастицами клетками (фиг. 9А). Тепловая карта сигнатурной экспрессии верхних генов TCM в TCM, наивных и контрольных клетках после суток 8 обработки (фиг. 9В). Анализ обогащения набора генов для генов, дифференциально экспрессированных в обработанных Foxo13A NP в сравнении с контрольными NP-обработанными клетками, которые тестировали относительно сигнатурных наборов верхних и нижних генов TCM.

Фиг. 10А-Д. Наночастицы мРНК делают возможной специфичную трансфекцию CD34<sup>+</sup> гематопоэтических стволовых клеток человека с минимальными эффектами, оказываемыми на размножение или фенотип (фиг. 10А). Направленное воздействие на CD105 делает возможной специфичную трансфекцию CD34<sup>+</sup> HSC клеток, полученных из мобилизованных PBSC. Эти клетки оставляли необработанными или трансфицировали с использованием eGFP-кодирующей мРНК в NP, покрытых PGA, сопряженным с неспецифическим контрольным антителом (контрольные Ab-eGFP NP) или против CD105  $\alpha$ -CD105 NP). Эффективность трансфекции анализировали с помощью проточной цитометрии через 24 ч после экспозиции NP (фиг. 10В). Эффективность трансфекции NP в CD34<sup>+</sup> образцах от 3 независимых доноров (фиг. 10С). Размножение CD34<sup>+</sup> HSC *in vitro* после добавления контрольных или CD105-направленных NP. Клетки трансфицировали как на фиг. 10А, затем оценивали общее число клеток в сутки 0, 4 и 8 сутки после экспозиции частиц (фиг. 10D). Проточный цитометрический анализ HSC маркеров CD34, CD133 и CD49f в не трансфицированных клетках (штриховая линия) или клетках, которые обрабатывали средством против CD105 мРНК (сплошная линия), после суток 8 в культуре. Результаты показывают, что добавление NP не изменяет поверхностную экспрессию ключевых маркеров стволовых клеток.

Фиг. 11. Образцовые вспомогательные последовательности.

#### Подробное описание

Успешная генетическая терапия зависит от механизмов успешной доставки гена в выбранные клетки, представляющие интерес. В настоящее время вирусные системы, такие как те, в которых используют лентивирусные векторы, представляют собой наиболее распространенный путь для достижения длительной генетической терапии. Эта генетическая терапия основана на текущей клеточной экспрессии белков терапевтического значения. Хотя такие вирусные системы позволяют эффективно доставлять гены для генетической терапии, они являются неизбирательными, дорогостоящими и не широко доступными. Кроме того, непрерывная экспрессия терапевтического белка может снижаться с течением времени из-за клеточных событий, которые наступают с течением времени.

Электропорация также разработана в качестве механизма доставки генов в клетки для генетической терапии. Однако электропорация основана на механическом разрушении и пермеабиллизации клеточных мембран, таким образом снижая жизнеспособность клеток, что делает их меньше чем идеальными для терапевтического использования. Кроме того, подобно способам на основе вирусов, электропорация не избирательно доставляет гены в конкретные типы клеток из гетерогенного пула, так что этому должен предшествовать процесс отбора и очистки клеток.

Данное раскрытие предусматривает композиции и способы, которые позволяют быстро и избирательно модифицировать клетки для достижения терапевтических целей посредством обеспечения временной экспрессии нуклеиновых кислот. Временная экспрессия ведет к постоянным терапевтическим изменениям в модифицированных клетках, обозначаемым в настоящем описании как эффекты "наскок-отход". Поскольку только временная экспрессия необходима для достижения длительного терапевтического эффекта, преодолены вопросы, касающиеся сниженной экспрессии терапевтического белка с течением времени. Кроме того, поскольку композиции и способы избирательно модифицируют выбранные типы клеток, перед модификацией не нужны процессы отбора или очистки клеток. Это ускоряет изготовление терапевтических клеток *ex vivo* и также делает возможной направленную генетическую модификацию клеток *in vivo*.

Эффекты наскок-отход, описанные в настоящем описании, становятся возможными при использо-

вании временной экспрессии нуклеиновых кислот, которая ведет к редактированию генов или временной экспрессии белков, которые перманентно изменяют фенотип клетки. Примеры нуклеиновых кислот, которые ведут к редактированию генов, включают TALEN, megaTALS, нуклеазы с цинковыми пальцами и системы CRISPR-Cas. Примеры белков, которые перманентно изменяют фенотип клетки, включают факторы транскрипции, киназы и рецепторы клеточной поверхности. Временная экспрессия относится к получению продукта рекомбинантного гена в течение короткого периода времени после переноса нуклеиновой кислоты в клетки. В конкретных вариантах осуществления временная экспрессия длится от 12 ч до 20 суток; от 18 ч до 18 суток; от 24 ч до 14 суток; или от 36 ч до 10 суток. Фенотип клетки относится к ее физическим характеристикам и/или ее местоположению в организме.

Существует множество применений композиций и способов, раскрытых в настоящем описании. Примеры включают редактирование генома лимфоцитов (например, гематопоэтических стволовых клеток (HSC)) с использованием направленных нуклеаз; увеличение силы вакцин посредством совместной инъекции носителей, нагруженных нуклеиновой кислотой, которые трансфицируют дендритные клетки для того, чтобы увеличивать их способность презентировать антигены; и трансфекцию Т-клеток, примированных вакциной, чтобы индуцировать долгоживущий фенотип памяти.

Конкретные варианты осуществления включают наноносители, которые могут направлять в конкретные выбранные клетки и выполнять контролируемую дозой доставку нуклеиновых кислот просто посредством смешивания наноносителей с клетками в культуре *ex vivo* или клетками внутри субъекта, *in vivo*. В конкретных вариантах осуществления наноносители включают:

- (1) направляющий на выбранную клетку лиганд;
- (2) носитель; и
- (3) нуклеиновые кислоты в носителе.

Конкретные варианты осуществления включают наноносители, в том числе:

- (1) направляющий на выбранную клетку лиганд;
- (2) носитель;
- (3) нуклеиновые кислоты в носителе; и
- (4) покрытие.

В конкретных вариантах осуществления направляющие на выбранную клетку лиганды могут включать поверхностно-закрепленные направляющие лиганды, которые избирательно связывают наноносители с выбранными клетками и инициируют быстрый индуцированный рецептором эндоцитоз для их интернализации. Как раскрыто более подробно в другом месте в настоящем описании, направляющие на выбранную клетку лиганды могут включать антитела, scFv белки, DART молекулы, пептиды и/или аптамеры. В конкретных вариантах осуществления используют антитела против CD8 для того, чтобы трансфицировать Т-клетки человека, и антитела, распознающие CD34, CD133 или CD46 для направленного воздействия на HSC.

В конкретных вариантах осуществления носители включают молекулу носителя, которая конденсирует и защищает нуклеиновые кислоты от ферментативного разрушения. Как раскрыто более подробно в другом месте в настоящем описании, носители могут включать положительно заряженные липиды и/или полимеры. В конкретных вариантах осуществления используют сложный поли(β-аминоэфир).

В конкретных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты инкапсулируют в носителе и, после клеточного захвата выбранной клеткой, экспрессируют средство редактирования генов и/или белок, который перманентно изменяет фенотип клетки. Как раскрыто более подробно в другом месте в настоящем описании, нуклеиновые кислоты могут включать синтетическую мРНК, которая экспрессирует megaTAL или фактор транскрипции. В конкретных вариантах осуществления используют мРНК, транскрибированную *in vitro* (см., например, Grudzien-Nogalska et al., *Methods Mol. Biol.* 969, 55-72 (2013)), которая экспрессирует:

- (i) фактор транскрипции FOXO1, который индуцирует CD8 Т-клетки памяти; или
- (ii) редко расщепляющую нуклеазу megaTAL (см., например, Boissel & Scharenberg, *Methods Mol. Biol.* 1239, 171-196 (2015)) для нарушения экспрессии Т-клеточного рецептора лимфоцитами.

В конкретных вариантах осуществления наноносители, раскрытые в настоящем описании, включают покрытие, которое защищает инкапсулированные нуклеиновые кислоты и снижает или предотвращает связывание вне мишени. Связывание вне мишени снижают или предотвращают посредством снижения поверхностного заряда наноносителей до нейтрального или отрицательного. Как раскрыто более подробно в другом месте в настоящем описании, покрытия могут включать нейтральные или отрицательные полимерные и/или липосомные покрытия. В конкретных вариантах осуществления используют полиглутаминовую кислоту (PGA) в качестве покрытия наноносителя. Когда используют, покрытие не обязательно покрывает весь наноноситель, но его должно быть достаточно для того, чтобы снижать связывание вне мишени наноносителем.

Когда раскрытые наноносители добавляют в гетерогенную смесь клеток (например, клеточную культуру *ex vivo* или окружение *in vivo*), сконструированные наноносители связываются с популяциями выбранных клеток и стимулируют рецепторно-опосредованный эндоцитоз; это процесс обеспечивает проникновение нуклеиновой кислоты (например, синтетической мРНК), которую они несут, и, следова-

тельно, выбранные клетки начинают экспрессировать кодируемую молекулу (фиг. 1А). Поскольку ядерный транспорт и транскрипция трансгена не требуются, этот процесс является быстрым и эффективным. Если необходимо, дополнительные применения наноносителей можно осуществлять до тех пор, пока не достигают желаемых результатов. В конкретных вариантах осуществления наноносители являются био-разрушаемыми и биосовместимыми, и, при изготовлении клеток *ex vivo*, модифицированные клетки можно легко отделять от несвязанных наночастиц посредством центрифугирования перед их инфузией субъекту для лечения.

В конкретных вариантах осуществления быстрый обозначает, что экспрессия кодируемой нуклеиновой кислоты начинается в выбранном типе клеток в пределах 24 ч или в пределах 12 ч экспозиции гетерогенного образца клеток для наноносителей, раскрытых в настоящем описании. Эта хронология возможна при использовании нуклеиновых кислот, таких как мРНК, транскрипция которых начинается почти незамедлительно (например, в пределах минут) после высвобождения в цитоплазму целевой клетки.

В конкретных вариантах осуществления эффективный обозначает, что перенос гена в целевые клетки (например, первичные Т-клетки человека) составляет >80% и модификация фенотипа возникает по меньшей мере в 80% этих клеток, по меньшей мере 90% этих клеток или 100% этих клеток. В конкретных вариантах осуществления эффективный обозначает, что перенос гена в целевые клетки составляет >80% и модификация фенотипа возникает по меньшей мере в 25% этих клеток, по меньшей мере в 33% этих клеток или по меньшей мере в 50% этих клеток. В конкретных вариантах осуществления модификация фенотипа может возникать в 1/3 выбранных клеток, которые захватывают наноносители, в которых доставляемая нуклеиновая кислота кодирует нуклеазу.

Дополнительные возможности и варианты осуществления раскрытия далее описаны более подробно.

Направляющие на выбранную клетку лиганды. Направляющие на выбранную клетку лиганды раскрытых наноносителей избирательно связывают клетки иммунной системы, представляющие интерес, в гетерогенной популяции клеток. В конкретных вариантах осуществления клетки иммунной системы, представляющие интерес, являются лимфоцитами. Лимфоциты включают Т-клетки, В-клетки, естественные киллерные (NK) клетки, моноциты/макрофаги и HSC.

Открыто несколько различных субпопуляций Т-клеток, каждая с определенной функцией. В конкретных вариантах осуществления направляющие на выбранную клетку лиганды достигают избирательного направления на конкретные популяции лимфоцитов через рецепторно-опосредованный эндоцитоз. Например, большинство Т-клеток имеют Т-клеточный рецептор (TCR), существующий в виде комплекса нескольких белков. Фактический Т-клеточный рецептор состоит из двух отдельных пептидных цепей, которые продуцируются с независимых генов  $\alpha$  и  $\beta$  Т-клеточного рецептора (TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ ) и носят название  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей TCR. Направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать  $\alpha$ - и/или  $\beta$ -цепи TCR, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот в эти Т-клетки.

$\gamma\delta$ -Т-клетки представляют небольшую субпопуляцию Т-клеток, которые имеют отличающийся Т-клеточный рецептор (TCR) на своих поверхностях. В  $\gamma\delta$ -Т-клетках, TCR состоит из одной  $\gamma$ -цепи и одной  $\delta$ -цепи. Эта группа Т-клеток является значительно менее обычной (2% от всех Т-клеток), чем  $\alpha\beta$  Т-клетки. Тем не менее, направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать  $\gamma$ - и/или  $\delta$ -цепи TCR, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот в эти Т-клетки.

CD3 экспрессирован на всех зрелых Т-клетках. Соответственно, направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать CD3 для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот во все зрелые Т-клетки. Активированные Т-клетки экспрессируют 4-1BB (CD137), CD69 и CD25. Соответственно, направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать 4-1BB, CD69 или CD25 для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот в активированные Т-клетки. Т-клетки также экспрессируют CD5 и трансферриновый рецептор, и их можно использовать для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот в Т-клетки.

Т-клетки дополнительно можно делить на классы хелперных клеток (CD4<sup>+</sup> Т-клеток) и цитотоксических Т-клеток (CTL, CD8<sup>+</sup> Т-клетки), которые включают цитолитические Т-клетки. Хелперные Т-клетки помогают другим белым клеткам крови в иммунологических процессах, в том числе в созревании В-клеток в плазматические клетки и активации цитотоксических Т-клеток и макрофагов, помимо других функций. Эти клетки также известны как CD4<sup>+</sup> Т-клетки, поскольку они экспрессируют белок CD4 на своей поверхности. Хелперные Т-клетки становятся активированными, когда пептидные антигены презентуют им с помощью молекул МНС класса II, которые экспрессированы на поверхности антиген-представляющих клеток (APC). Когда активированы, они быстро делятся и секретируют небольшие белки, называемые цитокинами, которые регулируют активный иммунный ответ или способствуют ему. Направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать CD4 для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот в хелперные Т-клетки.

Цитотоксические Т-клетки разрушают инфицированные вирусами клетки и опухолевые клетки, а

также вовлечены в отторжение трансплантата. Эти клетки также известны как CD8<sup>+</sup> Т-клетки, поскольку они экспрессируют гликопротеин CD8 на своей поверхности. Эти клетки распознают свои мишени посредством связывания с антигеном, связанным с МНС класса I, который присутствует на поверхности почти каждой клетки организма. Направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать CD8 для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот с CTL.

"Центральные Т-клетки памяти" (или "TCM"), как используют в настоящем описании, относятся к CTL, знакомым с антигеном, которые экспрессируют CD62L или CCR7 и CD45RO на своей поверхности и не экспрессируют или имеют сниженную экспрессию CD45RA по сравнению с наивными клетками. В конкретных вариантах осуществления центральные клетки памяти являются положительными по экспрессии CD62L, CCR7, CD25, CD127, CD45RO и CD95 и имеют сниженную экспрессию CD45RA по сравнению с наивными клетками. Направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать CD62L, CCR7, CD25, CD127, CD45RO и/или CD95 для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот в TCM.

"Эффекторные Т-клетки памяти" (или "TEM"), как используют в настоящем описании, относятся к Т-клеткам, знакомым с антигеном, которые не экспрессируют или имеют сниженную экспрессию CD62L на своей поверхности по сравнению с центральными клетками памяти, и не экспрессируют или имеют сниженную экспрессию CD45RA по сравнению с наивными клетками. В конкретных вариантах осуществления эффекторные клетки памяти являются отрицательными по экспрессии CD62L и CCR7 по сравнению с наивными клетками или центральными клетками памяти и имеют переменную экспрессию CD28 и CD45RA. Эффекторные Т-клетки являются положительными по гранзиму В и перфорину по сравнению с Т-клетками памяти или наивными Т-клетками. Направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать гранзим В и/или перфорин для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот в TEM.

Регуляторные Т-клетки ("TREG") представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которые модулируют иммунную систему, поддерживают толерантность к собственным антигенам и элиминируют аутоиммунные заболевания. TREG экспрессируют CD25, CTLA-4, GITR, GARP и LAP. Направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать CD25, CTLA-4, GITR, GARP и/или LAP для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот в наивные TREG.

"Наивные" Т-клетки, как используют в настоящем описании, относятся к Т-клеткам, не знакомым с антигеном, которые экспрессируют CD62L и CD45RA и не экспрессируют CD45RO по сравнению с центральными или эффекторными клетками памяти. В конкретных вариантах осуществления наивные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты отличаются экспрессией фенотипических маркеров наивных Т-клеток, в том числе CD62L, CCR7, CD28, CD127 и CD45RA. Направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать CD62L, CCR7, CD28, CD127 и/или CD45RA для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот в наивные Т-клетки.

Естественные киллерные клетки (также известные как NK клетки, К клетки и киллерные клетки) активируются в ответ на интерфероны или цитокины макрофагального происхождения. Они служат для сдерживания вирусных инфекций, пока адаптивный иммунный ответ создает антиген-специфические цитотоксические Т-клетки, которые могут устранять инфекцию. NK клетки экспрессируют CD8, CD16 и CD56, но не экспрессируют CD3. Направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать CD8, CD16 и/или CD56 для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот в NK клетки.

Макрофаги (и их предшественники, моноциты) находятся в каждой ткани организма (в определенных случаях в виде микроглии, Купферовых клеток и остеокластов), где они поглощают апоптотные клетки, патогены и другие не собственные компоненты. Поскольку моноциты/макрофаги поглощают не собственные компоненты, конкретное средство, направленное на макрофаги или моноциты, не требуется на наноносителях, описанных в настоящем описании, для избирательного захвата этими клетками. Альтернативно, направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать CD11b, F4/80; CD68; CD11c; IL-4R $\alpha$ ; и/или CD163 для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновой кислоты в моноциты/макрофаги.

Незрелые дендритные клетки (т.е., до активации) поглощают антигены и другие не собственные компоненты на периферии и впоследствии, в активированной форме, мигрируют в Т-клеточные области лимфоидных тканей, где они обеспечивают презентацию антигена для Т-клеток. Таким образом, подобно макрофагам, направленное воздействие на дендритные клетки не обязательно основано на направляющем на выбранную клетку лиганде. Когда направляющий на выбранную клетку лиганд используют для того, чтобы избирательно направленно воздействовать на дендритные клетки, он может связывать следующие антигены CD: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD21, CD35, CD39, CD40, CD86, CD101, CD148, CD209 и DEC-205.

В-клетки можно отличать от других лимфоцитов по присутствию В-клеточного рецептора (BCR). Главная функция В-клеток состоит в образовании антител. В-клетки экспрессируют CD5, CD19, CD20,

CD21, CD22, CD35, CD40, CD52 и CD80. Направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD35, CD40, CD52 и/или CD80 для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот в В-клетки. Также антитела, направленные на изотипические константные области В-клеточных рецепторов (IgM, IgG, IgA, IgE), можно использовать для направленного воздействия на подтипы В-клеток.

Функциональный антиген 1 лимфоцитов (LFA-1) экспрессируют все Т-клетки, В-клетки и моноциты/макрофаги. Соответственно, направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать LFA-1 для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот в Т-клетки, В-клетки и моноциты/макрофаги.

На HSC также можно направленно воздействовать для избирательной доставки наноносителей, раскрытых в настоящем описании. HSC экспрессируют CD34, CD46, CD133, Sca-1 и CD117. Направляющие на выбранную клетку лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут связывать CD34, CD46, CD133, Sca-1 и/или CD117 для того, чтобы достигать избирательной доставки нуклеиновых кислот в гематопетические стволовые клетки.

"Избирательная доставка" обозначает, что нуклеиновые кислоты доставляют и экспрессируют с помощью одной или более выбранных популяций лимфоцитов. В конкретных вариантах осуществления избирательная доставка происходит исключительно в выбранную популяцию лимфоцитов. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% вводимых нуклеиновых кислот доставляют и/или экспрессируют в выбранной популяции лимфоцитов. В конкретных вариантах осуществления избирательная доставка гарантирует, что не лимфоцитарные клетки не экспрессируют доставляемые нуклеиновые кислоты. Например, когда направляющее средство представляет собой ген Т-клеточного рецептора (TCR), избирательность обеспечивают в силу того, что только Т-клетки имеют ζ-цепи, необходимые для экспрессии TCR. Избирательная доставка также может быть основана на отсутствии захвата нуклеиновой кислоты не выбранными клеткам или на присутствии специфического промотора в последовательности нуклеиновой кислоты. Например, временно экспрессируемые нуклеиновые кислоты могут включать специфический промотор CD3-5 Т-клеток. Дополнительные промоторы, которые позволяют добиваться избирательной доставки, включают: промотор вируса стволовых клеток мыши или дистальный промотор Ick для Т-клеток или HSC; промотор CD45, промотор WASP или промотор IFN-β для HSC; промотор B29 для В-клеток; или промотор CD14 или промотор CD11b для моноцитов/макрофагов.

Как указано, направляющие на выбранную клетку лиганды могут включать связывающие домены для мотивов, встречающихся на лимфоцитарных клетках. Направляющие на выбранную клетку лиганды также могут включать любой механизм избирательного связывания, делающий возможным избирательный захват лимфоцитами. В конкретных вариантах осуществления направляющие на выбранную клетку лиганды включают связывающие домены для мотивов Т-клеточных рецепторов; α-цепей Т-клеток; β-цепей Т-клеток; γ-цепей Т-клеток; δ-цепей Т-клеток;

CCR7; CD1a;  
 CD1b; CD1c; CD1d; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b; CD11c; CD16;  
 CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35; CD39; CD40;  
 CD45RA; CD45RO; CD46, CD52; CD56; CD62L; CD68; CD80; CD86; CD95;  
 CD101; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB); CD148; CD163; F4/80;  
 IL-4Rα; Sca-1; CTLA-4; GITR; GARP; LAP; гранзим В; LFA-1;  
 трансферринового рецептора; и их сочетания.

В конкретных вариантах осуществления связывающие домены включают лиганды клеточных маркеров, лиганды рецепторов, антитела, пептиды, пептидные аптамеры, нуклеиновые кислоты, аптамеры из нуклеиновых кислот, шпигельмеры или их сочетания. В рамках контекста направляющих на выбранную клетку лигандов, связывающие домены включают любое вещество, которое связывается с другим веществом для того, чтобы формировать комплекс, способный опосредовать эндоцитоз.

"Антитела" представляют собой один из примеров связывающих доменов и включают целые антитела или связывающие фрагменты антител, например, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc и одноцепочечные Fv фрагменты (scFv) или любые биологически эффективные фрагменты иммуноглобулинов, которые специфично связываются с мотивом, экспрессируемым лимфоцитами. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты включают целиком или частично поликлональные антитела, моноклональные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, синтетические антитела, химерные антитела, биспецифические антитела, минитела и линейные антитела.

Антитела, происходящие от человека, или гуманизированные антитела обладают сниженной или нулевой иммуногенностью у человека и имеют более низкое число не иммуногенных эпитопов по сравнению с не принадлежащими человеку антителами. Антитела и их фрагменты в целом выбирают так, чтобы иметь сниженный уровень или нулевую антигенность у субъектов-людей.

Антитела, которые специфически связывают мотив, экспрессируемый лимфоцитом, можно получать с использованием способов получения моноклональных антител, способов фагового дисплея, способов создания антител человека или гуманизированных антител или способов с использованием трансгенного животного или растения, сконструированного для продуцирования антител, как известно специалистам в данной области (см., например, патенты США №№ 6291161 и 6291158). Доступны библиотеки фагового дисплея для частично или полностью синтетических антител, и можно осуществлять скрининг антител или их фрагментов, которые могут связываться с лимфоцитарным мотивом. Например, связывающие домены можно идентифицировать посредством скрининга фаговой Fab библиотеки на Fab фрагменты, которые специфически связываются с мишенью, представляющей интерес (см. Hoet et al., *Nat. Biotechnol.* 23:344, 2005). Также доступны библиотеки фагового дисплея для антител человека. Дополнительно, традиционные стратегии разработки гибридом с использованием мишени, представляющей интерес, в качестве иммуногена в удобных системах (например, мышах, NuMAb mouse®, TC mouse™, KM-mouse®, ламах, курах, крысах, хомяках, кроликах и т.д.) можно использовать для разработки связывающих доменов. В конкретных вариантах осуществления антитела специфически связываются с мотивами, экспрессируемыми выбранными лимфоцитами, и не обладают перекрестной реактивностью с неспецифическими компонентами или не родственными мишенями. После идентификации можно выделять и/или определять аминокислотную последовательность или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело.

В конкретных вариантах осуществления связывающие домены направляющих на выбранную клетку лигандов включают антитела к мотиву T-клеточного рецептора; антитела к  $\alpha$ -цепям T-клеток; антитела к  $\beta$ -цепям T-клеток; антитела к  $\gamma$ -цепям T-клеток; антитела к  $\delta$ -цепям T-клеток; антитела к CCR7; антитела к CD1a; антитела к CD1b; антитела к CD1c; антитела к CD1d; антитела к CD3; антитела к CD4; антитела к CD5; антитела к CD7; антитела к CD8; антитела к CD11b; антитела к CD11c; антитела к CD16; антитела к CD19; антитела к CD20; антитела к CD21; антитела к CD22; антитела к CD25; антитела к CD28; антитела к CD34; антитела к CD35; антитела к CD39; антитела к CD40; антитела к CD45RA; антитела к CD45RO; антитела к CD46; антитела к CD52; антитела к CD56; антитела к CD62L; антитела к CD68; антитела к CD80; антитела к CD86; антитела к CD95; антитела к CD101; антитела к CD117; антитела к CD127; антитела к CD133; антитела к CD137 (4-1BB); антитела к CD148; антитела к CD163; антитела к F4/80; антитела к IL-4R $\alpha$ ; антитела к Sca-1; антитела к CTLA-4; антитела к GITR; антитела к GARP; антитела к LAP; антитела к гранзиме B; антитела к LFA-1; или антитела к трансферриновому рецептору. Эти связывающие домены также могут состоять из scFv фрагментов вышеуказанных антител.

Пептидные аптамеры включают пептидную петлю (которая является специфичной к целевому белку), прикрепленную обоими концами к белковому каркасу. Это двойное структурное ограничение значительно увеличивает аффинность связывания пептидного аптамера до уровней, сравнимых с антителом. Варибельная длина петли обычно составляет от 8 до 20 аминокислот (например, от 8 до 12 аминокислот), а каркас может представлять собой любой белок, который стабилен, растворим, имеет небольшие размеры и не токсичен (например, тиоредоксин-A, тройной мутант стефина A, зеленый флуоресцентный белок, эглин C и клеточный фактор транскрипции Spl). Выбор пептидного аптамера можно осуществлять с использованием различных систем, таких как дрожжевая система двойных гибридов (например, дрожжевая система двойных гибридов Gal4) или улавливающая система со взаимодействием LexA.

Аптамеры из нуклеиновых кислот представляют собой одноцепочечные лиганды из нуклеиновых кислот (ДНК или РНК), которые функционируют посредством укладки в конкретную глобулярную структуру, которая определяет связывание с целевыми белками или другими молекулами с высокой аффинностью и специфичностью, как описано в Osborne et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:5-9, 1997; и Cerchia et al., *FEBS Letters* 528:12-16, 2002. В конкретных вариантах осуществления аптамеры являются небольшими (15 KD; или между 15 и 80 нуклеотидами или между 20 и 50 нуклеотидами). Аптамеры в целом выделяют из библиотек, состоящих из  $10^{14}$ - $10^{15}$  случайных олигонуклеотидных последовательностей, посредством процедуры, называемой SELEX (систематическая эволюция лигандов посредством экспоненциального обогащения; см., например, Tuerk et al., *Science*, 249:505-510, 1990; Green et al., *Methods Enzymology*. 75-86, 1991; и Gold et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 64: 763-797, 1995). Дополнительные способы создания аптамеров описаны, например, в патентах США №№ 6344318; 6331398; 6110900; 5817785; 5756291; 5696249; 5670637; 5637461; 5595877; 5527894; 5496938; 5475096; и 527016. Шпигельмеры схожи с аптамерами из нуклеиновых кислот, за исключением того, что по меньшей мере одно звено  $\beta$ -рибозы заменяют на звено  $\beta$ -D-дезоксирибозы или модифицированного сахара, выбранное, например, из  $\beta$ -D-рибозы,  $\alpha$ -D-рибозы,  $\beta$ -L-рибозы.

Можно также использовать другие средства, которые могут способствовать интернализации и/или трансфекции лимфоцитов, такие как комплексы поли(этиленimina)/ДНК (PEI/ДНК).

Носители. Как указано, носители в раскрытых наноносителях выполняют функцию конденсации и защиты нуклеиновых кислот от ферментативного разрушения. Особенно эффективные материалы для использования в качестве носителей включают положительно заряженные липиды и/или полимеры, в том числе сложный поли( $\beta$ -аминоэфир).

Дополнительные примеры положительно заряженных липидов включают сложные эфиры фосфатидной кислоты с аминспиртом, такие как сложный эфир дипальмитоилфосфатидной кислоты или дисстеароилфосфатидной кислоты с гидроксипропиламином. Более конкретные примеры положительно заряженных липидов включают:

3 $\beta$ -[N-(N',N'-диметиламиноэтил)карбамоил]холестерин (DC-chol);  
 N,N'-диметил-N,N'-диоктациламмония бромид (DDAB);  
 N,N'-диметил-N,N'-диоктациламмония хлорид (DDAC);  
 1,2-диолеоилоксипропил-3-диметил-гидроксипропиламин хлорид (DORI);  
 1,2-диолеоилокси-3-[триметиламмонио]-пропан (DOTAP);  
 N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмони хлорид (DOTMA);  
 дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC);  
 1,2-диоктадецилокси-3-[триметиламмонио]-пропан (DSTAP); и  
 катионные липиды, описанные, например, в Martin et al., *Current Pharmaceutical Design* 2005, 11, 375-394.

Примеры положительно заряженных полимеров, которые можно использовать в качестве носителей в данном раскрытии, включают полиамины; органические полиамины (например, полиэтиленмин (PEI), полиэтиленминцеллюлозы); поли(амидоамины) (PAMAM); полиаминокислоты (например, полилизин (PLL), полиаргинин); полисахариды (например, целлюлозу, декстран, DEAE декстран, крахмал); спермин, спермидин, поли(винилбензилтриалкиламмоний), поли(4-винил-N-алкил-пиридиний), поли(акрилоилтриалкиламмоний) и белки Tat.

Смеси липидов и полимеров в любой концентрации и в любом соотношении также можно использовать. Смешивание полимеров различных типов в различных соотношениях с использованием различных марок может вести к характеристикам, которые взяты от каждого из составляющих полимеров. Также могут быть унаследованы химические свойства различных концевых групп.

Без ограничения вышеуказанным, конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, также могут использовать пористые наночастицы, сконструированные из любого материала, способного формировать пористую сеть. Образцовые материалы включают металлы, переходные металлы и металлоиды. Образцовые металлы, переходные металлы и металлоиды включают литий, магний, цинк, алюминий и диоксид кремния. В конкретных вариантах осуществления пористые наночастицы включают диоксид кремния. Исключительно большая площадь поверхности мезопористого диоксида кремния (превышающая 1000 м<sup>2</sup>/г) допускает нагрузку нуклеиновыми кислотами на уровнях, превышающих стандартные ДНК носители, такие как липосомы.

Можно формировать носители многих различных геометрических форм, в том числе сферические, кубические, пирамидальные, продолговатые, цилиндрические, тороидальные и т. п. Нуклеиновые кислоты можно включать в поры носителей различными способами. Например, нуклеиновые кислоты можно инкапсулировать в пористых наночастицах. В других аспектах, нуклеиновые кислоты можно ассоциировать (например, ковалентно и/или нековалентно) с поверхностью или в непосредственной близости под поверхностью пористых наночастиц. В конкретных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты можно встраивать в пористые наночастицы, например, встраивать в материал пористых наночастиц. Например, нуклеиновые кислоты можно встраивать в полимерную матрицу из полимерных наночастиц.

Покрытия. В конкретных вариантах осуществления наночастицы, раскрытые в настоящем описании, включают покрытие, которое защищает инкапсулированные нуклеиновые кислоты и снижает или предотвращает связывание вне мишени. Связывание вне мишени снижают или предотвращают посредством снижения поверхностного заряда наночастиц до нейтрального или отрицательного. Как раскрыто более подробно в другом месте в настоящем описании, покрытия могут включать нейтральные или отрицательно заряженные полимерные и/или липосомные покрытия. В конкретных вариантах осуществления покрытие представляет собой плотное покрытие поверхности из гидрофильного и/или нейтрально заряженного гидрофильного полимера, достаточное для того, чтобы предотвращать экспонирование инкапсулированных нуклеиновых кислот для окружения перед высвобождением в выбранную клетку. В конкретных вариантах осуществления покрытие покрывает по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% поверхности наночастицы. В конкретных вариантах осуществления покрытие включает полиглутаминовую кислоту (PGA).

Примеры нейтрально заряженных полимеров, которые можно использовать в качестве покрытия в вариантах осуществления по раскрытию, включают полиэтиленгликоль (PEG); поли(пропиленгликоль); и сополимеры полиалкиленоксидов, (PLURONIC®, BASF Corp., Mount Olive, NJ).

Нейтрально заряженные полимеры также включают цвиттер-ионные полимеры. Цвиттер-ионный относится к свойству нейтральности суммарного заряда при наличии как положительного, так и отрицательного электрического заряда. Цвиттер-ионные полимеры могут вести себя как участки клеточных мембран, которые препятствуют адгезии клеток и белков.

Цвиттер-ионные полимеры содержат цвиттер-ионные конституционные звенья, содержащие боковые группы (т.е. группы, свисающие с главной цепи полимера) с цвиттер-ионными группами. Образцо-

вые цвиттер-ионные боковые группы включают группы карбоксибетаина (например,  $-Ra-N+(Rb)(Rc)-Rd-CO_2-$ , где Ra представляет собой линкерную группу, которая ковалентно сопрягает главную цепь полимера с катионным азотным центром групп карбоксибетаина, Rb и Rc представляют собой заместители азота и Rd представляет собой линкерную группу, которая ковалентно сопрягает катионный азотный центр с карбоксигруппой в группе карбоксибетаина).

Примеры отрицательно заряженных полимеров включают альгиновые кислоты; полисахариды карбоновых кислот; карбоксиметилцеллюлозу; карбоксиметилцеллюлозу-цистеин; каррагенан (например, Gelcarin® 209, Gelcarin® 379); хондроитинсульфат; гликозаминогликаны; мукополисахариды; отрицательно заряженные полисахариды (например, декстрансульфат); поли(акриловую кислоту); поли(D-аспарагиновую кислоту); поли(L-аспарагиновую кислоту); натриевую соль поли(L-аспарагиновой кислоты); поли(D-глутаминовую кислоту); поли(L-глутаминовую кислоту); натриевую соль поли(L-глутаминовой кислоты); поли(метакриловую кислоту); альгинат натрия (например, Protanal® LF 120M, Protanal® LF 200M, Protanal® LF 200D); карбоксиметилцеллюлозу натрия (СМС); сульфатированные полисахариды (гепарины, арагопектины); пектин, желатин и гиалуроновую кислоту.

В конкретных вариантах осуществления полимеры, раскрытые в настоящем описании, могут включать "звездообразные полимеры", которые относятся к разветвленным полимерам, в которых два или больше ветвей полимера выходят из сердцевины. Сердцевина представляет собой группу атомов, имеющую две или больше функциональных групп, от которых можно продлевать ветви посредством полимеризации.

В конкретных вариантах осуществления ветви представляют собой цвиттер-ионные или отрицательно заряженные полимерные ветви. Для звездообразных полимеров, предшественники ветвей можно превращать в цвиттер-ионные или отрицательно заряженные полимеры через гидролиз, облучение ультрафиолетом или нагрев. Полимеры также можно получать любым способом полимеризации, эффективным для полимеризации ненасыщенных мономеров, в том числе радикальной полимеризацией с переносом атома (ATRP), полимеризацией путем обратимого присоединения и фрагментирования (RAFT), фотополимеризацией, полимеризацией с раскрытием кольца (ROP), конденсацией, реакцией Майкла, реакцией образования/роста ветви или другими реакциями.

Липосомы представляют собой микроскопические везикулы, содержащие по меньшей мере один концентрический липидный бислой. Липиды, образующие везикулы, выбирают так, чтобы достигать точно определенной степени текучести или жесткости конечного комплекса. В конкретных вариантах осуществления липосомы предусматривают липидную композицию, которая представляет собой внешний слой, окружающий пористую наночастицу.

Липосомы могут быть нейтральными (холестерин) или биполярными, и включают фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин (PC), фосфатидилэтанолламин (PE), фосфатидилинозит (PI) и сфингомиелин (SM), и биполярные липиды других типов, в том числе диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE), с длинной углеводородной цепи в диапазоне 14-22, насыщенные или с одной или более двойными связями C=C. Примеры липидов, способных образовывать стабильную липосому, отдельно, или в комбинации с другими липидными компонентами, представляют собой фосфолипиды, такие как гидрогенизированный фосфатидилхолин сои (HSPC), лецитин, фосфатидилэтанолламин, лизолецитин, лизофосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, сфингомиелин, цефалин, кардиолипин, фосфатидная кислота, цереброзиды, дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE), диолеилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), пальмитоилолеилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеилфосфатидилэтанолламин (POPE) и диолеилфосфатидилэтанолламин 4-(N-малеимидо-метил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal). Дополнительные не содержащие фосфор липиды, которые можно встраивать в липосомы, включают стеариламин, додециламин, гексадециламин, изопропилмиристал, триэтанолламинлаурилсульфат, алкиларилсульфат, ацетилпальмитат, глицеринрицинолеат, гексадецилстеарат, амфотерные акриловые полимеры, полиэтилоксилированные амиды жирных кислот, DDAB, диоктадецилдиметиламмония хлорид (DODAC), 1,2-димиристоил-3-триметиламмоний-пропан (DMTAP), DOTAP, DOTMA, DC-Choi, фосфатидную кислоту (PA), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеилфосфатидилглицерин, DOPG, и дицетилфосфат. В конкретных вариантах осуществления липиды, используемые для того, чтобы создавать липосомы, раскрытые в настоящем описании, включают холестерин, гидрогенизированный фосфатидилхолин сои (HSPC) и дериватизированный липид PEG-DSPE, образующий везикулы.

Способы формирования липосом описаны, например, в патентах США №№ 4229360; 4224179; 4241046; 4737323; 4078052; 4235871; 4501728; и 4837028, а также в Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980) и Hope et al., Chem. Phys. Lip. 40:89 (1986).

Нуклеиновые кислоты.

Нуклеиновые кислоты, используемые в наноносителях, раскрытых в настоящем описании, могут временно экспрессировать средства редактирования генов и/или изменяющие фенотип белки, которые регулируют судьбу, дифференцировку, жизнеспособность и/или направленную миграцию клетки (см., например, фиг. 1B, 1C).

В конкретных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты включают синтетическую мРНК. В конкретных вариантах осуществления синтетическую мРНК конструируют для увеличенной внутриклеточной стабильности с использованием 5'-кэпа. Можно использовать множество различных структур 5'-кэпа для того, чтобы создавать 5'-кэп синтетической молекулы мРНК. Например, кэп Anti-Reverse Cap Analog (ARCA) содержит 5'-5'-трифосфатную гуанин-гуаниновую связь, где один гуанин содержит N7 метильную группу, а также 3'-О-метильную группу. Синтетические молекулы мРНК также можно снабжать кэпом после транскрипции с использованием ферментов, отвечающего за образование структур 5'-кэпа. Например, рекомбинантный кэпирующий фермент вируса осповакцины и рекомбинантный фермент 2'-О-метилтрансфераза могут создавать классическую 5'-5'-трифосфатную связь между ближайшим к 5'-концу нуклеотидом в мРНК и гуаниновым нуклеотидом, где гуанин содержит N7 метилирование, а последний 5'-нуклеотид содержит 2'-О-метил, создавая структуру Cap1. Это ведет к кэпу с более высокой трансляционной способностью и клеточной стабильностью и сниженной активации клеточных провоспалительных цитокинов.

Синтетическую мРНК или другие нуклеиновые кислоты также можно делать циклическими. Синтетическую мРНК можно циклизовать или конкатемеризовать для того, чтобы создавать молекулу, способную к трансляции, чтобы содействовать взаимодействиям между связывающими поли-А белками и связывающими 5'-конец белками. Механизм замыкания кольца или конкатемеризации может проходить по меньшей мере по 3 различным путям:

- 1) химический,
- 2) ферментативный и
- 3) катализируемый рибозимами.

Вновь образованная 5'-/3'-связь может быть внутримолекулярной или межмолекулярной.

На первом пути 5'-конец и 3'-конец нуклеиновой кислоты может содержать химически реакционно-способные группы, которые, находясь близко друг к другу, образуют новую ковалентную связь между 5'-концом и 3'-концом молекулы. 5'-конец может содержать реакционноспособную группу сложного NHS-эфира и 3'-конец может содержать 3'-аминоконцевой нуклеотид так, что в органическом растворителе 3'-аминоконцевой нуклеотид на 3'-конце синтетической молекулы мРНК будет подвержен нуклеофильной атаке по фрагменту сложного 5'-NHS-эфира с образованием новой 5'-/3'-амидной связи.

На втором пути РНК лигазу T4 можно использовать для ферментативного образования связи 5'-фосфорилированной молекулы нуклеиновой кислоты с 3'-гидроксильной группой нуклеиновой кислоты с образованием новой фосфодиэфирной связи. В образцовой реакции 1 мкг молекулы нуклеиновой кислоты можно инкубировать при 37°C в течение 1 ч с 1-10 Ед РНК лигазы T4 (New England Biolabs, Ipswich, Mass.) в соответствии с протоколом производителя. Реакция лигирования может протекать в присутствии расщепленного олигонуклеотида, способного к спариванию оснований как с 5'-, так и с 3'-областью в соприкосновении, чтобы способствовать реакции ферментативного лигирования.

На третьем пути 5'- или 3'-конец матрицы кДНК кодирует последовательность рибозима лигазы так, что во время транскрипции *in vitro*, получаемая молекула нуклеиновой кислоты может содержать последовательность активного рибозима, способного лигировать 5'-конец молекулы нуклеиновой кислоты с 3'-концом молекулы нуклеиновой кислоты. Рибозим лигазу можно извлекать из интрона I группы, интрона I группы, вируса гепатита дельта, шпилечного рибозима или можно отбирать с помощью SELEX (систематическая эволюция лигандов посредством экспоненциального обогащения). Реакция рибозима лигазы может занимать от 1 до 24 ч при температурах между 0 и 37°C.

В конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает плазмиду, кДНК, или мРНК, которые могут включать, например, последовательность (например, ген) для экспрессии средства редактирования генов или изменяющего фенотип белка. Подходящие плазмиды включают стандартные плазмидные векторы и миникольцевые плазмиды, которые можно использовать для переноса гена в лимфоцит. Нуклеиновые кислоты (например, миникольцевые плазмиды) дополнительно могут содержать любую дополнительную информацию о последовательности для того, чтобы содействовать временной экспрессии в избирательно модифицированной клетке. Например, нуклеиновые кислоты могут содержать промоторы, такие как общие промоторы, тканеспецифические промоторы, специфические промоторы клеток и/или специфические промоторы цитоплазмы. Как указано, промоторы и плазмиды (например, миникольцевые плазмиды) в целом хорошо известны в данной области, и их можно получать с использованием общепринятых способов.

Как используют в настоящем описании, термин "ген" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует средство редактирования генов или изменяющий фенотип белок. Это определение включает различные полиморфизмы последовательностей, мутации и/или варианты последовательностей, в которых такие изменения не оказывают влияния на функцию средства редактирования генов или изменяющего фенотип белок. Термин "ген" может включать не только кодирующие последовательности, но также регуляторные области, такие как промоторы, энхансеры и области терминации. Термин дополнительно может включать все интроны и другие последовательности ДНК, сплайсированные из транскрипта мРНК, наряду с вариантами, являющимися результатом участков альтернативного сплайсинга. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие средство редактирования генов или

изменяющий фенотип белок, могут представлять собой РНК, которая направляет экспрессию средства редактирования генов или изменяющего фенотип белка. Эти последовательности нуклеиновой кислоты включают последовательности РНК, которые транслируют, в конкретных вариантах осуществления, в белок. Последовательности нуклеиновой кислоты включают как полноразмерные последовательности нуклеиновой кислоты, так и не полноразмерные последовательности, получаемые из полноразмерного белка. Последовательности также могут включать вырожденные кодоны нативной последовательности или последовательностей, которые можно вводить для обеспечения кодонных предпочтений конкретного лимфоцита. Последовательности генов для кодирования средств редактирования генов или изменяющих фенотип белков, раскрытых в настоящем описании, доступны в общедоступных базах данных и публикациях. Как используют в настоящем описании, термин "кодирующие" относится к свойству последовательностей нуклеиновых кислот, таких как плаزمиды, ген, кДНК, мРНК, служить в качестве матриц для синтеза средств редактирования генов или изменяющих фенотип белков.

Средства редактирования генов. Как используют в настоящем описании, средства редактирования генов включают продукты экспрессии от временной экспрессии нуклеиновых кислот, как раскрыто в настоящем описании, которые модифицируют или влияют на конкретные последовательности эндогенного генома выбранных клеток. В конкретных вариантах осуществления модификация включает удаление или разрушение эндогенного гена так, что белок, кодируемый эндогенным геном, более не экспрессируется, экспрессируется в сниженной степени, экспрессируется в виде неполного белка, нестабильного белка, неправильно уложенного белка и/или нефункционального белка. В конкретных вариантах осуществления эффект представляет собой сниженную экспрессию белка через механизм по типу интерферирующей РНК. Таким образом, средства редактирования генов можно использовать для редактирования генома, например, разрушения генов, редактирования генов посредством гомологичной рекомбинации и генной терапии, чтобы вставлять терапевтические гены в подходящие хромосомные целевые участки в геноме человека.

В конкретных вариантах осуществления используют подобные активаторам транскрипции эффекторные нуклеазы (TALEN) в качестве средств редактирования генов. TALEN относятся к слитым белкам, содержащим подобный активаторам транскрипции эффекторный (TALE) ДНК связывающий белок и расщепляющий ДНК домен. TALEN используют для редактирования генов и геномов, индуцируя двухцепочечные разрывы (DSB) в ДНК, которые индуцируют механизмы репарации в клетках. В целом, два TALEN должны связывать и фланкировать с каждой стороны целевой участок ДНК для расщепляющего ДНК домена, чтобы димеризоваться и индуцировать DSB. Репарация DSB в клетке происходит посредством негомологичного соединения концов (NHEJ) или посредством гомологичной рекомбинации (HR) с экзогенным двухцепочечным донорным фрагментом ДНК.

Как указано, TALEN сконструированы для связывания целевой последовательности, например, в эндогенном геноме и разрезания ДНК в определенном местоположении в целевой последовательности. TALE в TALEN представляют собой ДНК-связывающие белки, секретируемые бактериями *Xanthomonas*. ДНК-связывающий домен из TALE содержит высоко консервативный повтор из 33 или 34 аминокислот, с отличающимися остатками в 12-м и 13-м положениях каждого повтора. Эти два положения, обозначаемые как повторный вариабельный двойной остаток (RVD), демонстрируют сильную корреляцию с распознаванием конкретных нуклеотидов. Соответственно, специфичность направленного воздействия можно усовершенствовать посредством изменения аминокислот в RVD и встраивания нестандартных RVD аминокислот.

Примеры расщепляющих ДНК доменов, которые можно использовать в слитых конструкциях TALEN, представляют собой эндонуклеазу дикого типа и вариант эндонуклеазы FokI. Домен FokI выполняет функцию димера, для которого необходимы две конструкции с уникальными ДНК-связывающими доменами для участков на целевой последовательности. Расщепляющий домен FokI осуществляет расщепление в спейсерной последовательности из пяти или шести пар оснований, разделяющей две инвертированных половины участка.

В конкретных вариантах осуществления используют MegaTAL в качестве средств редактирования генов. MegaTAL имеют структуру одноцепочечной редко расщепляющей нуклеазы, в которой TALE сливаются с расщепляющим ДНК доменом мегануклеазы. Мегануклеазы, также известные как эндонуклеазы хоуминга, представляют собой отдельные пептидные цепи, которые имеют функцию распознавания ДНК и нуклеазы в одном и том же домене. В отличие от TALEN, для megaTAL необходима только доставка одной пептидной цепи для функциональной активности. Образцовый белок megaTAL со специфичностью к TCR $\alpha$  предоставлен в виде SEQ ID NO: 1 на фиг. 11.

В конкретных вариантах осуществления используют нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN) в качестве средств редактирования генов. ZFN представляют собой класс сайт-специфических нуклеаз, сконструированных для связывания и расщепления ДНК в конкретных положениях. ZFN используют для введения DSB в конкретный участок в последовательности ДНК, что позволяет ZFN направленно воздействовать на уникальные последовательности в геноме многих различных клеток. Кроме того, после двухцепочечного разрыва, имеет место гомологичная рекомбинация или негомологичное соединение концов для репарации DSB, что, таким образом, делает возможным редактирование генома.

ZFN синтезируют посредством слияния ДНК-связывающего домена цинкового пальца с расщепляющим ДНК доменом. ДНК-связывающий домен включает от трех до шести белков цинковых пальцев, которые представляют собой факторы транскрипции. Расщепляющий ДНК домен включает каталитический домен, например, из эндонуклеазы FokI.

Гидовую РНК можно использовать, например, вместе со средствами редактирования генов, такими как системы CRISPR-Cas. Системы CRISPR-Cas включают повторы CRISPR и набор CRISPR-ассоциированных генов (Cas).

Повторы CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) включают кластер из коротких прямых повторов, разделенных спейсерами из коротких переменных последовательностей размера, схожего с повторами. Размер повторов находится в диапазоне от 24 до 48 пар оснований, и они имеют некоторую симметрию диад, что подразумевает формирование вторичной структуры, такой как шпилька, несмотря на то, что повторы не являются истинно палиндромными. Спейсеры, разделяющие повторы, точно совпадают с последовательностями из прокариотических вирусов, плазмид и транспозонов. Гены Cas кодируют нуклеазы, хеликазы, РНК-связывающие белки и полимеразу, которая разматывает и режет ДНК. Cas1, Cas2 и Cas9 являются примерами генов Cas.

Источник спейсеров CRISPR показывает, что системы CRISPR-Cas играют определенную роль в адаптивном иммунитете у бактерий. Существует по меньшей мере три типа реакций иммунной системы CRISPR-Cas, и гены Cas1 и Cas2 участвуют в приобретении спейсеров во всех трех. Приобретение спейсеров, включающее захват и вставку внедряющейся вирусной ДНК в локус CRISPR, происходит на первом этапе адаптивного иммунитета. Более конкретно, приобретение спейсеров начинается с того, что Cas1 и Cas2 распознают внедряющуюся ДНК и расщепляют протоспейсер, который лигируют в прямой повтор смежно с лидерной последовательностью. Впоследствии происходит одноцепочечная репарация с расширением и дубликация прямого повтора.

Следующий этап адаптивного иммунитета, связанного с CRISPR, включает биогенез CRISPR РНК (крРНК), который происходит по-разному в системе CRISPR-Cas каждого типа. В целом, во время этого этапа CRISPR транскрипт расщепляют гены Cas для введения крРНК. В системе I типа Cas6e/Cas6f расщепляет транскрипт. В системе II типа используют транскрипционную РНК для того, чтобы формировать дцРНК, которую расщепляют с помощью Cas9 и РНКазы III. В системе III типа используют гомолог Cas6 для расщепления.

На конечном этапе адаптивного иммунитета, связанного с CRISPR, процессированная крРНК ассоциируется с белками Cas для того, чтобы формировать интерференционные комплексы. В системах I и II типов белки Cas взаимодействуют со смежными с протоспейсером мотивами (PAM), которые представляют собой короткие ДНК последовательности 3-5 п.о., для разрушения внедряющейся ДНК, тогда как для систем III типа не требуется взаимодействие с PAM для разрушения. В системе типа III-B, для разрушения, крРНК образует пары оснований с мРНК вместо целевой ДНК.

Таким образом, системы CRISPR-Cas выполняют функцию иммунной системы наподобие интерферирующих РНК у прокариот. Технологию CRISPR-Cas использовали для того, чтобы инактивировать гены в клеточных линиях и клетках человека. В качестве примера, систему CRISPR-Cas9, которая основана на системе II типа, использовали в качестве средства для редактирования генома.

Для системы II типа необходимы три компонента: Cas9, крРНК и тракрРНК. Систему можно упрощать, объединяя тракрРНК и крРНК в одну синтетическую гидовую РНК (sgRNA).

Разработано по меньшей мере три различных нуклеазы Cas9 для редактирования генома. Первая представляет собой Cas9 дикого типа, которая вводит DSB в конкретный участок ДНК, что ведет к активации механизма репарации DSB. DSB можно репарировать с помощью пути NHEJ или с помощью пути репарации, направляемой по гомологии (HDR). Вторая представляет собой мутантный Cas9, известный как Cas9D10A, только с активностью нуклеазы, что обозначает, что она расщепляет только одну нить ДНК и не активирует NHEJ. Таким образом, репарация ДНК происходит только по пути HDR. Третья представляет собой Cas9 с дефицитом нуклеазы (dCas9), которая не обладает расщепляющей активностью, но способна связывать ДНК. Следовательно, dCas9 способна направленно воздействовать на конкретные последовательности генома без расщепления. Сливая dCas9 с различными эффекторными доменами, dCas9 можно использовать в качестве инструмента сайленсинга или активации генов.

На многие гены можно направленно воздействовать для средств редактирования генов, избирательно доставляемых с помощью наноносителей, раскрытых в настоящем описании. Конкретные примеры включают направленное воздействие на гены фосфатаз Shp1 (например, SEQ ID NO: 2), гены рецепторов PD1 (например, SEQ ID NO: 3), гены TCR $\alpha$  (например, SEQ ID NO: 4); гены CCR5 (например, SEQ ID NO: 5) и/или гены CXCR4 (например, SEQ ID NO: 6).

У человека ген PTPN6 кодирует Shp-1 (фосфатазу-1, содержащую домен области 2 гомологии src; также известную как тирозинпротеинфосфатаза нерцепторного типа 6 (PTPN6)). N-концевая часть Shp-1 содержит два гомологичных Src домена (SH2), которые действуют в качестве белковых фосфотирозин-связывающих доменов, взаимодействующих с другими клеточными компонентами для того, чтобы модулировать их взаимодействие с субстратами. Shp-1 играет ключевую роль в качестве регулятора нескольких путей передачи сигнала, участвующих в гемопоэзе, и взаимодействует с различными фосфо-

белками, участвующими в гематопоэтической клеточной сигнализации. Shp-1 связывает рецепторы факторов роста, такие как рецепторы для EPO, IL-3, GM-CSF и M-CSF, и другие сигнальные белки через фосфорилирование тирозина белка. Shp-1 также опосредует ингибиторные сигналы, запускаемые с помощью иммуноглобулиновых доменов  $\gamma$ Fc (Fc VRIIB1), ингибиторного рецептора NK клеток, T-клеточного рецептора (TCR), B-клеточного рецептора (BCR), CD22 и CD72. Существуют альтернативно сплайсированные варианты гена PTPN6, кодирующие различные изоформы. Образцовые последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие Shp-1 млекопитающих, можно найти по номерам доступа Genbank: NM\_080549, NM\_053908.1 и NM\_013545.

Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают направленное воздействие на гены фосфатазы Shp1, чтобы изменять T-клеточную сигнализацию. Активность фосфатазы Shp1 ограничивает функциональную активность высокоаффинных T-клеточных рецепторов, ослабляя терапевтическое использование этих рецепторов, чтобы направленно воздействовать на редкие или низкоаффинные опухолевые антигены. (Hebeisen M, et al., SHP-1 phosphatase activity counteracts increased T cell receptor affinity. JCI. 2013). Кроме того, активность Shp1 связана с ослабленной противоопухолевой активностью T-клеточных терапевтических продуктов в солидных опухолях. (Moon EK, et al., Multifactorial T-cell Hypofunction That Is Reversible Can Limit the Efficacy of Chimeric Antigen Receptor-Transduced Human T cells in Solid Tumors, Clinical Cancer Research, 2014) По этим причинам, понижающая регуляция Shp1 может усиливать специфическое распознавание и функциональную активность T-клеток и терапевтических T-клеточных продуктов.

PD1 (белок 1 запрограммированной гибели клеток; также известный как кластер дифференцировки 279 (CD279)), представляет собой рецептор клеточной поверхности, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов. Он экспрессируется на поверхности активированных T-клеток, B-клеток и макрофагов, и у человека его кодирует ген PDCD. Структурно PD-1 содержит внеклеточный IgV-домен, трансмембранную область и внутриклеточный хвост. Внутриклеточный хвост содержит два сайта фосфорилирования, расположенные в иммунорецепторном тирозиновом ингибиторном мотиве и иммунорецепторном тирозиновом мотиве переключателя, что подсказывает, что PD-1 вовлечен в сигналы отрицательной регуляции TCR. PD-1 является иммунной контрольной точкой. Он осуществляет отрицательную регуляцию иммунной системы посредством предотвращения активации T-клеток, что снижает аутоиммунитет и способствует аутоотолерантности. PD-1 выполняет свою функцию через содействие апоптозу в антиген-специфических T-клетках в лимфатических узлах, при этом одновременно снижая апоптоз в регуляторных T-клетках (супрессорных T-клетках). PD-1 связывает лиганды PD-L1 и PD-L2. Образцовые последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие PD-1 млекопитающих, можно найти по номерам доступа Genbank: AY238517, NM\_001106927 и KJ865858.

Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают направленное воздействие на гены рецепторов PD1. Блокада PD1 антителами продемонстрировала высокую терапевтическую эффективность, но потенциально также может вести к нежелательным иммунологическим явлениям, влияющим на желудочно-кишечную, печеночную и эндокринную системы, а также другие органы. (Postow MA, Managing Immune Checkpoint-Blocking Antibody Side Effects, ASCO, 2015). Посредством избирательного удаления или снижения экспрессии рецептора PD1 на инфузируемых терапевтических T-клеточных продуктах через редактирование генов, можно минимизировать побочные воспалительные эффекты вне мишени, при этом поддерживая усиленную активность *in vivo* у инфузируемых T-клеток.

Как указано ранее, T-клеточные рецепторы (TCR) экспрессируются на поверхности T-лимфоцитов, которые играют определенную роль в распознавании фрагментов антигена в виде пептидов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Гены  $\alpha$ -цепей TCR можно найти по номерам доступа Genbank: X04954, X72904.1 и L21699.1.

Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают направленное воздействие на гены  $\alpha$ -цепей TCR. Экспрессия эндогенного TCR может препятствовать экспрессии сконструированных T-клеточных рецепторов и опосредовать аутоиммунные или аллореактивные реакции.

Направленное воздействие на гены  $\alpha$ -цепей TCR может усовершенствовать экспрессию сконструированных T-клеточных рецепторов и допускать частичную независимость от донора при изготовлении T-клеточного продукта.

CCR5 (хемокиновый рецептор 5 типа; также известный как CD195), экспрессируется на поверхности T-клеток, макрофагов, дендритных клеток, эозинофилов и микроглии. У человека его кодирует ген CCR5. CCR5 представляет собой рецептор, сопряженный с G-белком, относящийся к семейству  $\beta$ -хемокиновых рецепторов, интегрального белка.

Многие формы вирусов, в том числе HIV, используют CCR5 в качестве корецептора для проникновения в клетки-хозяева. CCR5 обозначают как корецепторы, поскольку для проникновения HIV необходимо связывание его гликопротеина (gp120) как с CD4, так и с корецептором (CCR5) для проникновения в клетку-хозяина.

Соответственно один путь, чтобы препятствовать вирусной инфекции, состоит в блокировании или снижении экспрессии CCR5. Разработано несколько антагонистов рецептора CCR5, чтобы препятство-

вать взаимодействию между CCR5 и гликопротеином gp120 оболочки HIV. Примеры таких антагонистов включают PRO140 (Progenies), викривирок (Schering Plough), аплавирок (GlaxoSmithKline) и маравирок (Pfizer). Примеры лигандов для CCR5 включают RANTES, MIP-1 $\beta$  и MIP-1 $\alpha$ . Эти лиганды способны подавлять инфекцию HIV-1 *in vitro*. Образцовые последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CCR5 млекопитающих, можно найти по номерам доступа Genbank: U66285, FJ573195 и AF022990.

Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают направленное воздействие на гены CCR5 для того, чтобы снижать проникновение вируса, такое как проникновение HIV, в клетки.

У человека ген CXCR4 кодирует CXCR4 (CXC хемокиновый рецептор 4 типа; также известный как фузин или CD184). Подобно CCR5, CXCR4 является корецептором для проникновения вируса в клетки, в том числе для проникновения HIV в клетки. CXCR4 также экспрессируют клетки злокачественных опухолей многих типов. CXCR4 также представляет собой  $\alpha$ -хемокиновый рецептор со специфичностью к стромальному фактору 1 (SDF-1 или CXCL12), молекуле с хемотаксической активностью для лимфоцитов. SDF-1 подавляет репликацию T-тропных изолятов HIV-1. Образцовые последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CCR4 млекопитающих, можно найти по номерам доступа Genbank: NM\_001008540, NM\_022205 и NM\_009911.

Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают направленное воздействие на гены CXCR4 для того, чтобы снижать проникновение вирусов, такое как проникновение HIV, в клетки.

Как указано, конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, основаны на экспрессии изменяющих фенотип белков. Изменяющие фенотип белки могут регулировать, например, дифференцировку, жизнеспособность или направленную миграцию клеток. Примеры изменяющих фенотип белков включают, например, FOXO1, LKB1, TERT, CCR2b и CCR4.

FOXO1 (белок 01 с боксом Forkhead или forkhead в рабдомиосаркоме) представляет собой фактор транскрипции, который у человека кодирует ген FOXO1 (например, SEQ ID NO: 7). FOXO1 избирательно встроен в генетическую программу, которая регулирует ответы CD8<sup>+</sup> T-клеток памяти на инфекцию (Kim et al., *Immunity*, 2013, 39(2): 286-97). Kim et al., показали, что мыши без FOXO1 в активированных CD8<sup>+</sup> T-клетках имеют дефектные вторичные, но не первичные, ответы на инфекцию *Listeria monocytogenes*. Там же. Предшественники T-клеток памяти экспрессировали более высокие количества FOXO1 по сравнению с короткоживущими эффекторными T-клетками, что способствовало образованию и поддержанию предшественников T-клеток памяти. Там же. Также показано, что фактор транскрипции Tcf7 и хемокиновый рецептор CCR7 взаимодействуют с FOXO1. Там же.

FOXO1 также играет определенную роль в содействии перехода от эффекторов к клеткам памяти и функциональному созреванию CD4 и CD8 T-клеток памяти (Tejara et al., *J. of Immunology*, 2013, 191(1):187-199). Несмотря на то, что FOXO1 не требуется для дифференцировки эффекторных клеток, CD8 T-клетки памяти демонстрировали признаки старения в отсутствие FOXO1, что вело к ослабленным вторичным ответам и слабому защитному иммунитету. Там же. Образцовые последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие FOXO1 млекопитающих, можно найти по номерам доступа Genbank: BC021981, NM\_001191846 и NM\_019739. Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают экспрессию FOXO1.

LKB1 (киназа B1 печени, также известная как антиген почечной карциномы NY-REN-19 или серин/треонинкиназа 11 (STK11)), представляет собой серин/треониновую протеинкиназу, кодируемую у человека геном STK11. LKB1 является критическим регулятором развития, жизнеспособности, активации и метаболизма T-клеток (Maclver, *J. Immunol.* 2011, 187(8): 4187-4198). LKB1-дефицитные T-клетки демонстрируют дефекты в клеточной пролиферации и жизнеспособности и измененный гликолитический и липидный метаболизм. Там же. LKB1 также активирует группу киназ, включающую киназы, родственные AMPK и AMPK, которые подавляют рост и пролиферацию при недостатке энергетических питательных веществ. AMPK, киназы, родственные AMPK, и LKB1 играют важную роль в поддержании полярности клетки, тем самым ингибируя рост опухолевых клеток. Образцовые последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие LKB1 млекопитающих, можно найти по номерам доступа Genbank: NM\_000455, NM\_001108069 и AB015801. Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают экспрессию LKB1. Образцовая последовательность LKB1 представляет собой SEQ ID NO: 8.

Фактор транскрипции 7, специфичный для T-клеток, (TCF7) представляет собой транскрипционный активатор, который играет важную роль в дифференцировке лимфоцитов. Этот ген экспрессируют преимущественно T-клетки. Кодированный белок может связывать энхансерный элемент и активировать ген CD3E, а также он может репрессировать гены CTNNB1 и TCF7L2 через механизм обратной связи. Образцовую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TCF7 человека, можно найти в NCBI Reference Sequence: NC\_000005.10. Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают экспрессию TCF7.

Эомезодермин (EOMES) представляет собой фактор транскрипции, который является ключевым

для эмбрионального развития мезодермы и центральной нервной системы у позвоночных. Также он вовлечен в дифференцировку эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Образцовую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую EOMES человека, можно найти в NCBI Reference Sequence: NC\_000003.12 и SEQ ID NO: 9. Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают экспрессию EOMES.

Ингибитор связывания ДНК 2, белок HLH (ID2), представляет собой транскрипционный регулятор, который содержит домен спираль-петля-спираль (HLH), но не основной домен. Члены семейства ингибитора связывания ДНК ингибируют функции основных факторов транскрипции типа спираль-петля-спираль доминантно-негативным образом посредством супрессии их партнеров гетеродимеризации через домены HLH. ID2 играет определенную роль в отрицательной регуляции дифференцировки клеток. Образцовую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ID2 человека, можно найти в NCBI Reference Sequence: NC\_000002.12 и SEQ ID NO: 10. Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают экспрессию ID2.

Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают изменение дифференцировки Т-клеток через экспрессию факторов транскрипции и сигнальных молекул, таких как FOXO1, LKB1, TCF7, EOMES и/или ID2, чтобы получать конкретные клеточные фенотипы, такие как клетки TEM, TCM или TREG, как необходимо для терапевтической эффективности. Клетки TCM и TEM демонстрировали повышенную терапевтическую эффективность в противоопухолевых моделях.

Теломеразы представляют собой РНК-зависимые полимеразы, которые удлиняют теломеры в нитях ДНК, тем самым позволяя стареющим клеткам становиться потенциально бессмертными, а не постмитотическими и апоптозными. Теломеразный комплекс человека включает две молекулы теломеразной обратной транскриптазы человека (TERT), теломеразную РНК (TR или TERC) и дискерин (DKC1). TERT, вместе с TERC, катализирует добавление нуклеотидов в последовательность TTAGGG на концы теломеры. Добавление повторяющихся последовательностей ДНК предотвращает разрушение хромосомных концов после клеточного деления через митоз. Таким образом, теломераза репарирует и удлиняет теломеры, что позволяет стареющим клеткам делиться и преодолевать предел Хейфлика от 50 до 70 клеточных делений. Образцовые последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие TERT млекопитающих, можно найти по номерам доступа Genbank: NM\_198253, NM\_053423, NM\_009354; и SEQ ID NO: 11.

Нормальные соматические клетки не имеют поддающейся обнаружению теломеразной активности. Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают экспрессию TERT. Исследования показали, что персистенция *in vivo* и противоопухолевый эффект адоптивно переносимых Т-клеток можно усиливать через доставку мРНК TERT (с использованием электропорации, Cell Discovery (2015) 1, 15040).

Однако обнаружено, что озлокачествленные опухолевые клетки имеют сниженную теломеразную активность. Соответственно, инструменты редактирования генов, как описано выше, можно использовать для направленного воздействия на TERT в озлокачественных опухолях.

CCR2b (С-С хемокиновый рецептор 2 типа или CD192 (кластер дифференцировки 192)) представляет собой рецептор, сопряженный с G-белком. У человека CCR2 кодирует ген CCR2. Этот ген кодирует две изоформы рецептора, CCR2a и CCR2b, посредством альтернативного сплайсинга одного гена.

CCR2b является родственным MIP-1 (рецептор RANTES) и представляет собой рецептор для моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), хемокина, который опосредует хемотаксис моноцитов. CCR2 также связывает MCP-2, MCP-3 и MCP-4, но с меньшей аффинностью. CCR2a и CCR2b различаются своим С-концевым хвостом. MCP-1 представляет собой небольшой хемокин, относящийся к семейству С-С хемокинов. MCP-1 вовлечен в рекрутинг моноцитов, Т-клеток памяти и дендритных клеток в места воспаления, вызываемого повреждением ткани или инфекцией. MCP-1 вовлечен в моноцитарную инфильтрацию при воспалительных заболеваниях, таких как псориаз, ревматоидный артрит, атеросклероз, а также воспалительная реакция на опухоли. Образцовые последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CCR2b млекопитающих, можно найти по номерам доступа Genbank: NM\_001123396 и NM\_009915 и SEQ ID NO: 12.

Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают экспрессию CCR2b для усиления направленной миграции терапевтических Т-клеток в опухоль (J. Immunother. 2010 Oct; 33(8):780-8).

CCR4 (С-С хемокиновый рецептор 4 или CD194 (кластер дифференцировки 194)) относится к семейству рецепторов, сопряженных с G-белком. У человека его кодирует ген CCR4. CCR4 представляет собой рецептор для MCP-1, MIP-1, RANTES, TARC и макрофагального хемокина, которые представляют собой СС хемокины. СС хемокины индуцируют миграцию моноцитов, а также других клеток, таких как НК клетки и дендритные клетки. В качестве примера, MCP-1 заставляет моноциты покидать кровотока и проникать в окружающую ткань, чтобы становиться тканевыми макрофагами. RANTES привлекает Т-клетки, эозинофилы и базофилы. Соответственно, CCR4 и его лиганды, СС хемокины, регулируют направленную клеточную миграцию лейкоцитов различных типов. Образцовые последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CCR4 млекопитающих, можно найти по номерам доступа Genbank: NM\_005508, NM\_133532 и NM\_009916.2 и SEQ ID NO: 13.

Конкретные варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, включают экспрессию CCR4 для усовершенствования опухолевого хоуминга и противоопухолевой активности терапевтических Т-клеток (Blood. 2009 Jun 18; 113 (25):6392-402).

В конкретных вариантах осуществления используют наноносители, раскрытые в настоящем описании, чтобы доставлять нуклеиновую кислоту для экспрессии выбранной клеткой, где использование не зависит от эффекта наскок-отход или дополняет его. В конкретных вариантах осуществления такие варианты осуществления могут усиливать рост, выживаемость, иммунную функцию и/или направленное воздействие выбранной клетки на опухолевую клетку. Примеры генетических модификаций включают те, которые делают возможной экспрессию химерного антигенного рецептора (CAR),  $\alpha\beta$  Т-клеточного рецептора (или его модификации) и/или провоспалительных цитокинов. Модификация CAR и/или модификации  $\alpha\beta$  Т-клеточного рецептора позволяют модифицированным лимфоцитам специфически направленно воздействовать на определенные типы клеток.

В одном из аспектов, генетически-модифицированные лимфоциты могут иметь усовершенствованное распознавание опухоли, запускать увеличенную пролиферацию нативных Т-клеток и/или продуцирование цитокинов.

"Химерные антигенные рецепторы" или "CAR" относятся к синтетически сконструированным рецепторами, содержащим по меньшей мере связывающий домен и эффекторный домен и необязательно спейсерный домен и/или трансмембранный домен.

Связывающие домены, в частности, могут включать любой пептид, который специфически связывает маркер на целевой клетке. Источники связывающих доменов включают вариабельные области антител различных видов (которые могут быть в форме антител, sFv, scFv, Fab, антител типа "grababody" на основе scFv или растворимого домена  $V_H$  или доменных антител). Эти антитела могут формировать антигенсвязывающие области с использованием только вариабельной области тяжелой цепи, т.е. эти функциональные антитела представляют собой гомодимеры только тяжелых цепей (обозначаемые как "антитела из тяжелых цепей") (Jespers et al., Nat. Biotechnol. 22:1161, 2004; Cortez-Retamozo et al., Cancer Res. 64:2853, 2004; Baral et al., Nature Med. 12:580, 2006; и Barthelemy et al., J. Biol. Chem. 283:3639, 2008).

Альтернативный источник связывающих доменов включает последовательности, которые кодируют случайные пептидные библиотеки, или последовательности, которые кодируют сконструированное многообразие аминокислот в петлевых областях альтернативных неантительных каркасов, таких как scTCR (см., например, Lake et al., Int. Immunol. 11:745, 1999; Maunard et al., J. Immunol. Methods 306:51, 2005; патент США № 8361794), домены фибриногена (см., например, Weisel et al., Science 230:1388, 1985), домены Кунитца (см., например, патент США № 6423498), сконструированные белки с анкириновыми повторами (DARPin) (Binz et al., J. Mol. Biol. 332:489, 2003 и Binz et al., Nat. Biotechnol. 22:575, 2004), связывающие домены фибронектина (аднектины или монотела) (Richards et al., J. Mol. Biol. 326:1475, 2003; Parker et al., Protein Eng. Des. Selec. 18:435, 2005 и Hackel et al. (2008) J. Mol. Biol. 381:1238-1252), минибелки с цистеиновым узлом (Vita et al. (1995) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 92:6404-6408; Martin et al. (2002) Nat. Biotechnol. 21:71, 2002 и Huang et al. (2005) Structure 13:755, 2005), домены с тетрапептидными повторами (Main et al., Structure 11:497, 2003 и Cortajarena et al., ACS Chem. Biol. 3:161, 2008), домены с богатыми лейцином повторами (Stumpp et al., J. Mol. Biol. 332:471, 2003), домены липокалина (см., например, WO 2006/095164, Beste et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 96:1898, 1999 и Schonfeld et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 106:8198, 2009), V-образные домены (см., например, публикацию патентной заявки США № 2007/0065431), домены лектина типа C (Zelensky and Gready, FEBS J. 272:6179, 2005; Beavil et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 89:753, 1992 и Sato et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 100:7779, 2003), mAb2 или Fcab<sup>TM</sup> (см., например, PCT публикации патентных заявок №№ WO 2007/098934; WO 2006/072 620), белки с повторами армадилло (см., например, Madhurantakam et al., Protein Sci. 21: 1015, 2012; PCT публикацию патентной заявки № WO 2009/040338), аффилин (Ebersbach et al., J. Mol. Biol. 372: 172, 2007), аффитело, авимеры, ноттины, финомеры, атримеры, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок-4 (Weidle et al., Cancer Gen. Proteo. 10:155, 2013) или тому подобное (Nord et al., Protein Eng. 8:601, 1995; Nord et al., Nat. Biotechnol. 15:772, 1997; Nord et al., Euro. J. Biochem. 268:4269, 2001; Binz et al., Nat. Biotechnol. 23:1257, 2005; Boersma and Pluckthun, Curr. Opin. Biotechnol. 22:849, 2011).

В конкретных вариантах осуществления связывающий домен представляет собой одноцепочечный Т-клеточный рецептор (scTCR), содержащий  $V_{\alpha/\beta}$ - и  $C_{\alpha/\beta}$ -цепи (например,  $V_{\alpha}$ - $C_{\alpha}$ ,  $V_{\beta}$ - $C_{\beta}$ ,  $V_{\alpha}$ - $V_{\beta}$ ) или содержащий пару  $V_{\alpha}$ - $C_{\alpha}$ ,  $V_{\beta}$ - $C_{\beta}$ ,  $V_{\alpha}$ - $V_{\beta}$  со специфичностью к мишени, представляющей интерес (например, комплексу пептид-MHC).

Образцовые CAR экспрессируют лиганд-связывающие домены, направленные, например, на мезотелин, Her2, WT-1 и/или EGRF. Образцовая модификация Т-клеточного рецептора направлена на TCR ассоциированного с меланомой антигена (MAGE) A3.

На следующие конкретные злокачественные опухоли можно направленно воздействовать, включая связывающий домен, который связывает ассоциированный клеточный маркер(ы), во внеклеточный компонент или CAR.

Целевая злокачественная опухоль	Клеточный маркер (ы)
Злокачественная опухоль предстательной железы	PSMA, WT1, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), SV40 T
Злокачественная опухоль молочной железы	HER2, ERBB2, ROR1
Злокачественная опухоль стволовых клеток	CD133
Злокачественная опухоль яичников	L1-CAM, внеклеточный домен MUC16 (MUC-CD), фолат-связывающий белок (фолатный рецептор), Lewis Y, ROR1, мезотелин, WT-1
Мезотелиома	Мезотелин
Почечноклеточная карцинома	Карбоксиангидраза IX (CAIX);
Меланома	GD2
Злокачественная опухоль поджелудочной железы	Мезотелин, CEA, CD24, ROR1
Злокачественная опухоль легких	ROR1

Без ограничения вышеуказанным, клеточные маркеры также включают A33; BAGE; Bcl-2;  $\beta$ -катенин;

B7H4; BTLA; CA125;

CA19-9; CD3, CD5; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD30;

CD33; CD37; CD40; CD52; CD44v6; CD45; CD56; CD79b; CD80; CD81;

CD86; CD123; CD134; CD137; CD151; CD171; CD276; CEA; CEACAM6; c-

Met; CS-1; CTLA-4;

циклин B1; DAGE; EBNA; EGFR; EGFRvIII, эфрин B2; ErbB2; ErbB3; ErbB4; EphA2; эстрогенный рецептор; FAP; ферритин;  $\alpha$ -фетопротеин (AFP); FLT1; FLT4; фолат-связывающий белок;

Frizzled; GAGE; G250; GD-2; GHRHR; GHR; GITR; GM2; gp75;

gp100 (Pmel 17); gp130; HLA; HER-2/neu; HPV E6; HPV E7; hTERT;

HVEM; IGF1R; IL6R; KDR; Ki-67; Lewis A; Lewis Y; LIFR $\beta$ ; LRP;

LRP5; LT $\beta$ R; MAGE; MART;

мезотелин; MUC; MUC1; MUM-1-B; мус; NYESO-1; O-ацетил GD-2; O-ацетил GD3; OSMR $\beta$ ; p53; PD1; PD-L1; PD-L2; PRAME; прогестероновый рецептор; PSA; PSMA; PTCH1; RANK; ras; Robo1; ROR1; сурвивин; TCR $\alpha$ ; TCR $\beta$ ; тенаascin; TGFBR1; TGFBR2; TLR7; TLR9; TNFR1; TNFR2; TNFRSF4; TWEAK-R; TSTA тирозиназу; VEGF; и WT1.

## Конкретные клеточные маркеры клеток злокачественных опухолей включают

Антиген злокачественн ой опухоли	Последовательность
PSMA	MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFLLGFLFGWFIKSSNEATNITPKHNMKA FLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYP NKTHPNYISIIINEDGNEIFNTSLFEP PPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYA RTEDFFKLERDMKINCSGKIVARIYKGVFRGNKVNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVK SYPDGNLPGGGVQRGNI LNLNGAGDPLTPGYPANAYARRGIAEAVGLPSIPVHPIGYY DAQKLLKMGGSAPPDSSWRGSLKVPYNVGPFGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIG TLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFAS WDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTK LKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRI SKLGSNDFEVFFQRLGIASGRARYTKN WETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSI VLPFDCRDY AVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDLSFAVKNFTEIASKF SERLQDFDKSNPIV LRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVD

	PSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA (SEQ ID № 14)
PSCA	MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDCLQVENCTQLGEQCWTARIRAVGLLT VISKGCSLNCVDDSQDYVVGKKNITCCDIDLNASGAHALQAAAAIALLPALGLLLWGP GQL (SEQ ID № 15)
Мезотелин	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNISS LSPRQLLGFPCAIEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPL DLLLLFNPDAFSGPQACTHFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLEPAALACWGVRSLLSEA DVRAIGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGPSTW SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSSWRQPERTILRPRFRREVEKT ACPSGKKAREIDESLI FYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELY PQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLKALLEVNGHEMSPQVATLIDRFVK GRGQLDKDTLDTLTAIFYPGYLCSLSPPELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLVYPA RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVPLPTVAEVQ KLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDSLVSQEAALSGT PCLLPGPFVLTVLALLLASTLA (SEQ ID № 16)
CD19	MPPPRLLFFLLFLTPEVREPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKP FLKLSLGLPGLGIHMRPLASWLFIFNVSQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGE LFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPCCVPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKPKSLLSLELKDDRPARDMW VMETGLLLPRATAQDAGKYCHRGNLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYL IFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTPPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSG LGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPPEEEEGEGYEEPDESEDEF YENDSNLQDQLSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVARMDFLS PHGSAWDPSREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGP DPAWGGGGRMGTWSTR (SEQ ID № 17)
CD20	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGP IAMQSGPKPLFRRMSSLVGPQTQSFFMRESKTLGAVQIMNG LFHIALGGLLMI PAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGMIMN SLSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKMESLNFI RAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPST QYCYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKQETI EIKKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIPIQEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP (SEQ ID № 18)
ROR1	MHRPRRRGTRPPLLALLAALLAARGAAAQETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLT DEPMNITTSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRLSFRSTIYGSRLRIRN LDTTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACAR FIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSS VPKPRDLCRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMLMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIG IPMADPINKNHKCYNSTGVDYRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHS YCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNMEILYILVPSVAIPLAIAL LFFVICVRNNQKSSAPVQRQPKHVRGQNVMSMLNAYKPKSKAKELPLSAVRFMEELG ECAFGKIYKGHLYLPGMHAQLVAIKTLKDYNNPQQWTEFQQEASLMAELHHPNIVCLLG AVTQEQPVCMLFEYINQGLHEFLIMRSPHSDVGCSSDEDGTVKSSLDHGDFLHIAIQIA AGMEYLSHFFVHKDLAARNILIGEQLHVKISDLGLSREIYSADYYRVQSKSLPIRWMP

	PEAIMYGKFFSSDSIWSFGVVLWEI FSGFLQPYYGFSNQEVIE MVRKRQLLPCSEDCPPR MYSMLMTECWNEIPRRRPRFKDIHVRLRSWEGLSSTTSSTTPSGGNATTQTTSLSASPVSN LSNPRYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPI PQNQRFIPINGYPI PPGYAAFPAAHYQPTG PPRVIQHCPPPKSRSPSSASGSTSTGHVTS LFPSSGSNQEANIPLLPHMSIPNHPGGMGIT VFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDANIHGHTESMISAE L (SEQ ID № 19)
WT1	MGHHHHHHHHHHSSGHI EGRHMRRVPGVAPTLVRSASETSEKRF FMCAYPGCNKRYFKLS HLQMHSRKHTGEKPYQCDFKDCERRFFRS DQLKRHQRRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHL KTHTRHTGKPFSCRWPSCQKKFARSDELVRHNNMHRNMTKLQ LAL (SEQ ID № 20)
CD33	DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLPCTFFHPI PYDKNSPVHGYWFREGAII SRDSPVATNK LDQEVQEEETQGRFRLLDGDSRNNCSLSIVDARRRDNNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVH VTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGT PPI FSWLSAAPTSLGPRTHSSVL IITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQ LNVTYVPQNPTTGI FPGDGS GKQETRAGV VHGAI GGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASP KHQKSKLH GPTETSSCSGAAPT VEMDEELHYASLN FHGMPNPSKDTSTEYSEVRTQ (SEQ ID № 21)

В конкретных вариантах осуществления связывающий домен может связывать PSMA. Многие антитела со специфичностью к PSMA известны специалистам в данной области, и могут быть легко охарактеризованы по последовательности, связыванию эпитопов и аффинности. В конкретных вариантах осуществления связывающий домен может включать лиганды против мезотелина (ассоциированные с лечением злокачественной опухоли яичников, злокачественной опухоли поджелудочной железы и мезотелиомы); против WT-1 (ассоциированные с лечением лейкоза и злокачественной опухоли яичников); против HIV-gag (ассоциированные с лечением ВИЧ-инфекций); или против цитомегаловируса (ассоциированные с лечением заболеваний CMV, таких как вирус герпеса).

В конкретных вариантах осуществления связывающий домен может связывать CD19. В конкретных вариантах осуществления связывающий домен представляет собой одноцепочечный Fv фрагмент (scFv), который содержит области  $V_H$  и  $V_L$  со специфичностью к CD19. В конкретных вариантах осуществления области  $V_H$  и  $V_L$  относятся к человеку. Образцовые области  $V_H$  и  $V_L$  включают сегменты специфического моноклонального антитела FMC63 против CD19. В конкретных вариантах осуществления scFv представляет собой scFv человека или гуманизированный scFv, содержащий вариабельную легкую цепь, содержащую последовательность CDRL1 RASQDISKYL N (SEQ ID NO: 22), последовательность CDRL2 SRLHSGV (SEQ ID NO: 23) и последовательность CDRL3 GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 24). В конкретных вариантах осуществления scFv представляет собой scFv человека или гуманизированный scFv, содержащий вариабельную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDRH1 DYGV S (SEQ ID NO: 25), последовательность CDRH2 VTWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 26) и последовательность CDRH3 YAMDYWG (SEQ ID NO: 27). Известны другие антитела, направленные на CD19, такие как SJ25C1 и HD37. (SJ25C1: Bejcek et al., Cancer Res 2005, PMID 7538901; HD37: Pezutto et al., JI 1987, PMID 2437199). В SEQ ID NO: 28 предоставлена аминокислотная последовательность scFv против CD19 ( $V_H$ - $V_L$ ) FMC63 и в SEQ ID NO: 29 предоставлена аминокислотная последовательность scFv против CD19 ( $V_H$ - $V_L$ ) FMC63.

В конкретных вариантах осуществления связывающий домен может связывать RORI. В конкретных вариантах осуществления scFv представляет собой scFv человека или гуманизированный scFv, содержащий вариабельную легкую цепь, содержащую последовательность CDRL1 ASGFDF S AY Y M (SEQ ID NO: 30), последовательность CDRL2 TIYPSSG (SEQ ID NO: 31) и последовательность CDRL3 ADRATYFCA (SEQ ID NO: 32). В конкретных вариантах осуществления scFv представляет собой scFv человека или гуманизированный scFv, содержащий вариабельную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDRH1 DTIDWY (SEQ ID NO: 33), последовательность CDRH2 VQSDGSYTKRPGVPDR (SEQ ID NO: 34) и последовательность CDRH3 YIGGYVFG (SEQ ID NO: 35). Специалистам в данной области известно множество антител со специфичностью к RORI, которые можно легко охарактеризовать по последовательности, связыванию эпитопов и аффинности.

В конкретных вариантах осуществления связывающий домен содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5% или на 100% идентична аминокислотной последовательности TCR  $V_\alpha$ ,  $V_\beta$ ,  $C_\alpha$  или  $C_\beta$ , где каждая CDR содержит ноль изменений или самое большее одно, два или три изменения, из TCR или его фрагмента или производного,

которые специфически связываются с мишенью, представляющей интерес.

В конкретных вариантах осуществления область  $V_{\alpha}$ ,  $V_{\beta}$ ,  $C_{\alpha}$  или  $C_{\beta}$  связывающего домена можно получать из или на основании  $V_{\alpha}$ ,  $V_{\beta}$ ,  $C_{\alpha}$  или  $C_{\beta}$  из известного TCR (например, высокоаффинного TCR), и она содержит одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) инсерций, одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) замен аминокислот (например, консервативных аминокислотных замен или неконсервативных аминокислотных замен), или комбинацию вышеуказанных изменений, по сравнению с  $V_{\alpha}$ ,  $V_{\beta}$ ,  $C_{\alpha}$  или  $C_{\beta}$  из известного TCR. Инсерция, делеция или замена может находиться где угодно в области  $V_{\alpha}$ ,  $V_{\beta}$ ,  $C_{\alpha}$  или  $C_{\beta}$ , в том числе на амино- или карбоксиконце или обоих концах этих областей, при условии, что каждая CDR содержит ноль изменений или самое большее одно, два или три изменения, и что связывающий домен, содержащий модифицированную область  $V_{\alpha}$ ,  $V_{\beta}$ ,  $C_{\alpha}$  или  $C_{\beta}$ , все еще может специфично связывать свою мишень с аффинностью, схожей с диким типом.

В конкретных вариантах осуществления область  $V_H$  связывающего домена по настоящему раскрытию можно получать из или на основании  $V_H$  известного моноклонального антитела, и она может содержать одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) инсерций, одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) замен аминокислот (например, консервативных аминокислотных замен или неконсервативных аминокислотных замен) или комбинацию вышеуказанных изменений по сравнению с  $V_H$  известного моноклонального антитела. Инсерция, делеция или замена может находиться в любом месте в области  $V_H$ , в том числе на амино- или карбоксиконце или на обоих концах этой области, при условии, что каждая CDR содержит ноль изменений или самое большее одно, два или три изменения и что связывающий домен, содержащий модифицированную область  $V_H$ , все еще может специфически связывать свою мишень с аффинностью, схожей со связывающим доменом дикого типа.

В конкретных вариантах осуществления область  $V_L$  в связывающем домене по настоящему раскрытию извлекают из или основывают на  $V_L$  известного моноклонального антитела, и она содержит одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) инсерций, одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) замен аминокислот (например, консервативных аминокислотных замен) или комбинацию вышеуказанных изменений по сравнению с  $V_L$  известного моноклонального антитела. Инсерция, делеция или замена может находиться в любом месте в области  $V_L$ , в том числе на амино- или карбоксиконце или на обоих концах этой области, при условии, что каждая CDR содержит ноль изменений или самое большее одно, два или три изменения и что связывающий домен, содержащий модифицированную область  $V_L$ , все еще может специфически связывать свою мишень с аффинностью, схожей со связывающим доменом дикого типа.

В конкретных вариантах осуществления связывающий домен содержит или представляет собой последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5% или на 100% идентична аминокислотной последовательности вариabельной области легкой цепи ( $V_L$ ) или вариabельной области тяжелой цепи ( $V_H$ ), или обеим, где каждая CDR содержит ноль изменений или самое большее одно, два или три изменения, из моноклонального антитела или его фрагмента или производного, которые специфически связываются с мишенью, представляющей интерес.

Эффекторные домены способны к передаче функциональных сигналов в клетку. В конкретных вариантах осуществления эффекторный домен будет непосредственно или опосредованно содействовать клеточной реакции посредством ассоциации с одним или более другими белками, которые непосредственно способствуют клеточной реакции. Эффекторные домены могут обеспечивать активацию по меньшей мере одной функции трансдуцированного лимфоцита, экспрессирующего CAR, при связывании с маркером, экспрессируемым на целевой клетке. Активация лимфоцита может включать одно или более из пролиферации, дифференцировки, активации или других эффекторных функций. В конкретных вариантах осуществления доставляемый полинуклеотид кодирует эффекторный домен.

Эффекторный домен может включать один, два, три или больше рецепторных сигнальных доменов, внутриклеточных сигнальных доменов, костимулирующих доменов или их сочетания. Любой внутриклеточный эффекторный домен, костимулирующий домен или оба из любой из множества сигнальных молекул (например, рецепторов сигнальной трансдукции) можно использовать в CAR по этому раскрытию.

Образцовые эффекторные домены включают таковые из 4-1BB, CD3 $\epsilon$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\zeta$ , CD27, CD28 (например, SEQ ID NO: 36), CD79A, CD79B, CARD11, DAP10, FcR $\alpha$ , FcR $\beta$ , FcR $\gamma$ , Fyn, HVEM, ICOS, Lck, LAG3, LAT, LRP, NOTCH1, Wnt, NKG2D, OX40, ROR2, Ryk, SLAMF1, Slp76, pT $\alpha$ , TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TRIM, Zap70, PTCH2 или любого их сочетания.

Активация Т-клеток может быть, так сказать, опосредованной двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: те, которые инициируют антигензависимую первичную активацию и обеспечивают сигнал, подобный Т-клеточному рецептору (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и те, которые действуют антигеннезависимым образом, чтобы

предоставлять вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как рецепторные тирозиновые активизирующие мотивы или iTAM. Примеры iTAM, которые содержат первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают те, которые получают из CD3 $\zeta$ , FeR $\gamma$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В конкретных вариантах осуществления эффекторный домен содержит цитоплазматическую часть, которая ассоциируется с цитоплазматическим сигнальным белком, где цитоплазматический сигнальный белок представляет собой рецептор лимфоцита или его сигнальный домен, белок, содержащий множество ITAM, костимулирующий фактор или любое их сочетание.

Примеры внутриклеточных сигнальных доменов включают цитоплазматические последовательности  $\zeta$ -цепи CD3 и/или корецепторы, которые действуют согласованно для того, чтобы инициировать сигнальную трансдукцию после вовлечения CAR, а также любое производно или вариант этих последовательностей и любую синтетическую последовательность, которая обладает такой же функциональной способностью. В конкретных вариантах осуществления можно разрабатывать внутриклеточный сигнальный домен CAR, который включает внутриклеточный сигнальный домен в сочетании с любым другим желаемым цитоплазматическим доменом(ами). Например, внутриклеточный сигнальный домен CAR может включать внутриклеточный сигнальный домен и костимулирующую сигнальную область. Костимулирующая сигнальная область относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличную от экспрессируемого лиганда маркера, который необходим для ответа лимфоцитов на маркер. Примеры таких молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD 137), OX40, CD30, CD40, функциональный антиген 1 лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83.

Спейсерные области можно специально разрабатывать для индивидуальных маркеров на мишенях, чтобы оптимизировать распознавание мишени. В конкретных вариантах осуществления длину спейсера можно выбирать, исходя из местоположения эпитопа маркера, аффинности антитела к эпитопу и/или способности лимфоцитов, экспрессирующих CAR, пролиферировать *in vitro* и/или *in vivo* в ответ на распознавание маркера.

Обычно спейсерная область находится между связывающим доменом и трансмембранным доменом CAR. Спейсерные области могут обеспечивать гибкость связывающего домена и делают возможными высокие уровни экспрессии в модифицированных клетках. В конкретных вариантах осуществления спейсерная область может иметь по меньшей мере от 10 до 250 аминокислот, по меньшей мере от 10 до 200 аминокислот, по меньшей мере от 10 до 150 аминокислот, по меньшей мере от 10 до 100 аминокислот, по меньшей мере от 10 до 50 аминокислот или по меньшей мере от 10 до 25 аминокислот и в том числе любое целое между конечными точками любого из перечисленных диапазонов. Конкретные варианты осуществления, спейсерная область имеет 250 аминокислот или меньше; 200 аминокислот или меньше, 150 аминокислот или меньше; 100 аминокислот или меньше; 50 аминокислот или меньше; 40 аминокислот или меньше; 30 аминокислот или меньше; 20 аминокислот или меньше; или 10 аминокислот или меньше.

В конкретных вариантах осуществления спейсерные области можно получать из шарнирной области иммуноглобулиноподобной молекулы, например, целой или частичной шарнирной области из IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека или IgG4 человека. Шарнирные области можно модифицировать для того, чтобы избежать нежелательных структурных взаимодействий, таких как димеризация. В конкретных вариантах осуществления целую или частичную шарнирную область можно комбинировать с одним или более доменами константной области иммуноглобулина. Например, часть шарнирной области можно комбинировать с целым или частичным доменом CH2 или CH3 или его вариантом.

CAR, раскрытые в настоящем описании, также могут включать трансмембранные домены. В конкретных вариантах осуществления полинуклеотид CAR кодирует трансмембранный домен. Трансмембранный домен обеспечивает закрепление CAR в мембране лимфоцита. Трансмембранный домен можно извлекать или природного или синтетического источника. Когда источник является природным, домен можно извлекать из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают по меньшей мере трансмембранную область (и) из  $\alpha$ -,  $\beta$ - или  $\zeta$ -цепи T-клеточного рецептора, CD28, CD3, CD45, CD4, CDS, CD9, CD16, CD22; CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В конкретных вариантах осуществления синтетические или варианты трансмембранные домены включают преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

В конкретных вариантах осуществления CAR включает слитый рецептор P28z, состоящий из одноцепочечного антитела (scFv) со специфичностью ко внеклеточному домену PSMA (J591) в комбинации с цитоплазматическими сигнальными доменами CD28 и CD3 $\zeta$ . В конкретных вариантах осуществления CAR включает P28z CAR с SEQ ID NO: 37. SEQ ID NO: 37 содержит мышинные компоненты. Аминокислотные положения 1-797 содержат scFv против PSMA (J592), тогда как положения 797-1477 содержат

трансмембранный домен CD8 мыши, сигнальный домен CD28 мыши и сигнальный домен CD3 $\zeta$  мыши. Любой домен P28z можно индивидуально заменять на оптимизированные домены. В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен и сигнальные домены в положениях 797-1477 в SEQ ID NO: 37 можно заменять конкретно на домены, оптимизированные для использования у человека или других животных. В конкретных вариантах осуществления любой целый или частичный связывающий домен, любой целый или частичный эффекторный домен, любой целый или частичный спейсерный домен и/или любой целый или частичный трансмембранный домен можно оптимизировать для использования у человека или других животных. В конкретных вариантах осуществления CAR P28z оптимизируют для использования у человека. Когда оптимизирован для человека, CAR P28z может иметь сниженную иммуногенность у человека и иметь более низкое число неиммуногенных эпитопов по сравнению с антителами, не принадлежащими человеку.

В конкретных вариантах осуществления ROR1-специфические и CD19-специфические CAR можно сконструировать с использованием сегментов V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> цепей из mAb 2A2, R12 и R11 (ROR1) и mAb FMC63 (CD19). Последовательности переменных областей для R11 и R12 предоставлены в Yang et al., Plos one 6(6) :e21018, June 15, 2011. Каждый scFV можно связывать с помощью белка (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 38) со спейсерным доменом, получаемым из IgG4-Fc (база данных UniProt: P01861, SEQ ID NO: 39), содержащим последовательности "Шарнир-CH2-CH3" (229 AA, SEQ ID NO: 40), "Шарнир-CH3" (119 AA, SEQ ID NO: 41) или только "Шарнир" (12 AA, SEQ ID NO: 42). Все спейсеры могут содержать замену S→P в домене "Шарнир", расположенную в положении 108 нативного белка IgG4-Fc, и могут быть связаны с 27AA трансмембранным доменом CD28 человека (SEQ ID NO: 43, образцовый полноразмерный CD28 см. в UniProt: P10747) и с сигнальным модулем эффекторного домена, включая (i) 41 AA цитоплазматический домен CD28 человека с заменой LL→GG, расположенной в положениях 186-187 нативного белка CD28 (SEQ ID NO: 44) или (ii) 42 AA цитоплазматический домен 4-1BB человека (UniProt: Q07011, SEQ ID NO: 45), каждый из которых можно связывать с 112 AA цитоплазматическим доменом 3-й изоформы CD3 $\zeta$  человека (UniProt: P20963, SEQ ID NO: 46). Конструкция кодирует элемент рибосомного перепрыгивания (SEQ ID NO: 47) и последовательность tEGFR (SEQ ID NO: 48) ниже по направлению считывания от химерного рецептора. tEGFR можно заменять или дополнять связывающей меточную кассету последовательностью, такой как STREP TAG® II (SEQ ID NO: 49), метка Мус (SEQ ID NO: 50), метка V5 (SEQ ID NO: 51), метка FLAG® (SEQ ID NO: 52), гистидиновая метка или другие пептиды или молекулы, как раскрыто в настоящем описании. Последовательности генов с оптимизированными кодонами, кодирующие каждый трансген, можно синтезировать (Life Technologies) и клонировать в лентивирусный вектор еrHIV7 с использованием участков рестрикции NheI и NotI. Лентивирусный вектор еrHIV7 можно получать из вектора рHIV7 посредством замены цитомегаловирусного промотора рHIV7 на промотор EF-1. ROR1-химерный рецептор, CD19-химерный рецептор, tEGFR или кодирующие меточную кассету лентивирусы можно получать в клетках 293T с использованием упаковочных векторов рCHGP-2, рCMV-Rev2 и рCMV-G, а также реактива для трансфекции CALPHOS® (Clontech).

HER2-специфические химерные рецепторы можно конструировать с использованием сегментов цепей V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> из HER2-специфического mAb, которое распознает проксимальный мембранный эпитоп на HER2, и scFV можно связывать с внеклеточными спейсерными доменами шарнира/CH2/CH3 IgG4, шарнира/CH3 IgG4 и только шарнира IgG4 и с трансмембранным доменом CD28, сигнальными доменами 4-1BB и CD3 $\zeta$ .

Химерный рецептор CD19 может содержать одноцепочечный переменный фрагмент, соответствующий последовательности CD19-специфического mAb FMC63 (scFv: V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>), спейсер, полученный из IgG4-Fc, содержащий домен "Шарнир-CH2-CH3" (229 AA, длинный спейсер) или только домен "Шарнир" (12 AA, короткий спейсер), и сигнальный модуль CD3 $\zeta$  с мембранными проксимальными костимулирующими доменами CD28 или 4-1BB, отдельно или в тандеме. Трансгенная кассета может содержать усеченный EGFR (tEGFR) ниже по направлению считывания от гена химерного рецептора и быть разделена расщепляемым элементом T2A, чтобы служить в качестве последовательности метки для трансдукции, отбора и отслеживания *in vivo* для модифицированных химерным рецептором клеток. tEGFR можно заменять или дополнять меточной кассетой, связывающей EchoSBM, например, STREP TAG® II (SEQ ID NO: 49), метку Мус (SEQ ID NO: 50), метку V5 (SEQ ID NO: 51), метку FLAG® (SEQ ID NO: 52), метку His или другие пептиды или молекулы, как раскрыто в настоящем описании.

Другие потенциальные конструкции нуклеиновых кислот CAR, которые кодируют различные связывающие лиганд домены, спейсерные области различной длины, различные внутриклеточные связывающие домены и/или различные трансмембранные домены, можно тестировать *in vivo* (в животной модели) и/или *in vitro* для того, чтобы идентифицировать CAR с усовершенствованной функцией относительно CAR генетически не модифицированных лимфоцитов и/или других. В конкретных вариантах осуществления CAR экспрессируют независимо от или в дополнение к эффекту наскок-отход, описанному в настоящем описании.

Размер наночастиц, раскрытых в настоящем описании, может варьировать в широком диапазоне, и его можно измерять различными путями. Например, наночастицы по настоящему раскрытию мо-

гут иметь минимальный размер 100 нм. Наночастицы по настоящему раскрытию также могут иметь минимальный размер, равный или меньше чем 500 нм, меньше чем 150 нм, меньше чем 100 нм, меньше чем 90 нм, меньше чем 80 нм, меньше чем 70 нм, меньше чем 60 нм, меньше чем 50 нм, меньше чем 40 нм, меньше чем 30 нм, меньше чем 20 нм или меньше чем 10 нм. В конкретных вариантах осуществления наночастицы могут иметь минимальный размер в диапазоне между 5 нм и 500 нм, между 10 нм и 100 нм, между 20 нм и 90 нм, между 30 нм и 80 нм, между 40 нм и 70 нм и между 40 нм и 60 нм. В конкретных вариантах осуществления размер представляет собой диаметр наночастиц или покрытых наночастиц. В конкретных вариантах осуществления популяция наночастиц по настоящему раскрытию может иметь средний минимальный размер, равный или меньше чем 500 нм, меньше чем 100 нм, меньше чем 90 нм, меньше чем 80 нм, меньше чем 70 нм, меньше чем 60 нм, меньше чем 50 нм, меньше чем 40 нм, меньше чем 30 нм, меньше чем 20 нм или меньше чем 10 нм. В конкретных вариантах осуществления популяция наночастиц в композиции по настоящему раскрытию может иметь средний диаметр в диапазоне между 5 нм и 500 нм, между 10 нм и 100 нм, между 20 нм и 90 нм, между 30 нм и 80 нм, между 40 нм и 70 нм и между 40 нм и 60 нм. Размеры наночастиц можно определять с использованием, например, общепринятых способов, таких как динамическое рассеяние света и/или электронная микроскопия.

Способы использования *ex vivo*. Наночастицы, раскрытые в настоящем описании, можно использовать при изготовлении клеток *ex vivo* (см., например, фиг. 1А и 4С). Например, способы могут включать получение лимфоцитов от субъекта. Лимфоциты, например, можно получать от субъекта с использованием любой процедуры, в целом известной в данной области.

Источники лимфоцитов включают кровь пупочного канатика, плацентарную кровь и периферическую кровь. Известны способы, касающиеся сбора, противодействия свертыванию и обработки и т.д. образцов крови. См., например, Alsever et al., 1941, N.Y. St. J. Med. 41:126; De Gowin, et al., 1940, J. Am. Med. Ass. 114:850; Smith, et al., 1959, J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 38:573; Rous and Turner, 1916, J. Exp. Med. 23:219; и Hum, 1968, Storage of Blood, Academic Press, New York, стр. 26-160. Источники лимфоцитов также включают костный мозг (см. Kodo et al., 1984, J. Clin. Invest. 73:1377-1384), эмбриональные клетки, клетки, полученные из аорто-гонадно-мезонефросной области, лимфу, печень, тимус и селезенку от доноров подходящего возраста. Можно осуществлять скрининг всех собранных образцов лимфоцитов на нежелательные компоненты и отбрасывать, обрабатывать или использовать в соответствии с существующими стандартами, принятыми на тот период.

В конкретных вариантах осуществления не требуется дополнительный сбор или выделение лимфоцитов перед воздействием на лимфоциты наночастицами, раскрытыми в настоящем описании, поскольку наночастицы избирательно направленно воздействуют на выбранные типы клеток в гетерогенной популяции клеток.

В конкретных вариантах осуществления может быть полезно задействовать некоторый дополнительный сбор и выделение клеток перед воздействием наночастиц, раскрытых в настоящем описании. Лимфоциты можно собирать и выделять из образца с использованием любого подходящего способа. Подходящие процедуры сбора и выделения включают магнитное разделение; сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS; Williams et al., 1985, J. Immunol. 135:1004; Lu et al., 1986, Blood 68(1):126-133); аффинную хроматографию; средства, соединяемые с моноклональным антителом или используемые в сочетании с моноклональным антителом; "пэннинг" с антителом, прикрепленным к твердой матрице (Broxmeyer et al., 1984, J. Clin. Invest. 73:939-953); избирательную агглютинацию с использованием лектина, например соевых бобов (Reisner et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:1164); и т.д. В конкретных вариантах осуществления можно использовать ограниченное выделение. Ограниченное выделение относится к обогащению неочищенных клеток, например, посредством удаления красных клеток крови и/или прилипших фагоцитов.

В конкретных вариантах осуществления рассматриваемый образец (например, образец крови) можно обрабатывать для того, чтобы отбирать/обогащать CD8<sup>+</sup> Т-клетки или CD34<sup>+</sup> HSPC с использованием антител против CD8 или против CD34, непосредственно или опосредованно конъюгированных с магнитными частицами, в связи с магнитным сепаратором клеток, например, CliniMACS® Cell Separation System (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Аналогичным образом, лимфоциты, экспрессирующие любые из маркеров, описанных выше (например, α-цепи Т-клеток; β-цепи Т-клеток; γ-цепи Т-клеток; δ-цепи Т-клеток;

CCR7; CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b;  
 CD11c; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35;  
 CD40; CD39; CD45RA; CD45RO; CD46; CD52; CD56; CD62L; CD68; CD69;  
 CD80; CD86; CD95; CD101; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB);  
 CD148; CD163; CD209; DEC-205; F4/80; IL-4Rα; Sca-1; CTLA-4;  
 GITR; GARP; LAP;

гранзим В; LFA-1; трансферриновый рецептор), можно выделять и обогащать для использования антител или других связывающих доменов для этих маркеров.

В конкретных вариантах осуществления наночастицы комбинируют с лимфоцитами перед процедурой размножения или на ее ранних этапах. Теперь этот подход допускает модификацию меньшего числа клеток, причем модификация распространяется по всей популяции клеток по мере ее роста. В конкретных вариантах осуществления после воздействия наночастиц, раскрытых в настоящем описании, которые обеспечивают эффект наскок-и-отход на основании временной экспрессии, может происходить размножение модифицированных лимфоцитов.

Размножение может происходить в присутствии одного или более факторов роста, таких как: ангиопоэтинподобные белки (Angptls, например, Angptl2, Angptl3, Angptl7, Angptl5 и Mfap4); эритропоэтин; фактор роста фибробластов-1 (FGF-1); лиганд Flt-3 (Flt-3L); гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF); инсулиноподобный фактор роста-2 (IGF-2); интерлейкин-3 (IL-3); интерлейкин-6 (IL-6); интерлейкин-7 (IL-7); интерлейкин-11 (IL-11); фактор стволовых клеток (SCF; также известный как лиганд c-kit или фактор роста тучных клеток); тромбопоэтин (TPO); и их аналоги (где аналоги включают любые структурные варианты факторов роста, обладающие биологической активностью встречаемого в природе фактора роста; см., например, WO 2007/1145227 и публикацию патента США № 2010/0183564).

В конкретных вариантах осуществления количество или концентрация факторов роста, подходящих для размножения лимфоцитов, представляет собой количество или концентрацию, эффективные для действия пролиферации. Популяции лимфоцитов предпочтительно размножают до получения достаточного числа клеток, чтобы обеспечивать по меньшей мере одну инфузию субъекту-человеку, обычно приблизительно от  $10^4$  клеток/кг до  $10^9$  клеток/кг.

Количество или концентрация факторов роста, подходящие для размножения лимфоцитов, зависят от активности препарата фактора роста и видовым соответствием между факторами роста и лимфоцитами, и т.д. В целом, когда фактор(ы) роста и лимфоциты относятся к одному и тому же виду, общее количество фактора роста в среде для культивирования находится в диапазоне от 1 нг/мл до 5 мкг/мл, от 5 нг/мл до 1 мкг/мл или от 5 нг/мл до 250 нг/мл. В конкретных вариантах осуществления количество факторов роста может находиться в диапазоне 5-1000 или 50-100 нг/мл.

В конкретных вариантах осуществления факторы роста присутствуют в условиях культивирования для размножения в следующих концентрациях: 25-300 нг/мл SCF, 25-300 нг/мл Flt-3L, 25-100 нг/мл TPO, 25-100 нг/мл IL-6 и 10 нг/мл IL-3. В конкретных вариантах осуществления можно использовать 50, 100 или 200 нг/мл SCF; 50, 100 или 200 нг/мл Flt-3L; 50 или 100 нг/мл TPO; 50 или 100 нг/мл IL-6; и 10 нг/мл IL-3.

Лимфоциты можно размножать в чашке для тканевой культуры, с которой связан белок внеклеточного матрикса, такой как фибронектин (FN), или его фрагмент (например, CH-296 (Dao et. al., 1998, Blood 92(12):4612-21)) или Ретронектин® (рекомбинантный фрагмент фибронектина человека; (Clontech Laboratories, Inc., Madison, WI)).

Агонисты Notch могут быть особенно полезны для размножения HSC. В конкретных вариантах осуществления HSC можно размножать посредством воздействия на HSC с помощью иммобилизованного агониста Notch и 50 нг/мл или 100 нг/мл SCF; иммобилизованного агониста Notch и 50 нг/мл или 100 нг/мл каждого из Flt-3L, IL-6, TPO и SCF; или иммобилизованного агониста Notch и 50 нг/мл или 100 нг/мл каждого из Flt-3L, IL-6, TPO и SCF и 10 нг/мл IL-11 или IL-3.

Как указано, лимфоциты получают от субъекта. В конкретных вариантах осуществления лимфоциты, модифицированные и размноженные по типу "наскок-и-отход", повторно вводят тому же субъекту, у которого получали исходный образец, в терапевтически эффективном количестве. В конкретных вариантах осуществления лимфоциты, модифицированные и размноженные по типу "наскок-и-отход", вводят другому субъекту в терапевтически эффективном количестве. Терапевтически эффективные количества описаны более подробно в другом месте в настоящем описании.

В этих вариантах осуществления лимфоциты, модифицированные и размноженные по типу "наскок-и-отход", можно формулировать в клеточных композициях для введения субъекту, клеточная композиция относится к размноженным клеткам, получаемым с фармацевтически приемлемым носителем для введения субъекту. В конкретных вариантах осуществления клеточные композиции вводят нуждающемуся в этом субъекту как только это обосновано возможно после завершения размножения и формулирования для введения.

В конкретных вариантах осуществления может быть необходимо или полезно криосохранять клетку. Термины "замороженный/заморозка" и "криосохраненный/криосохранение" можно использовать взаимозаменяемо. Заморозка включает лиофилизацию.

Как понятно специалисту в данной области, заморозка клеток может быть деструктивной (см. Mazur, P., 1977, Cryobiology 14:251-272), но существует множество процедур, доступных для того, чтобы предотвращать такое повреждение.

Например, повреждения можно избежать посредством:

(а) использования криозащитного средства,

(b) контроля скорости замораживания и/или

(c) хранения при температуре, достаточно низкой для того, чтобы минимизировать деструктивные реакции.

Образцовые криозащитные средства включают диметилсульфоксид (DMSO) (Lovelock and Bishop, 1959, *Nature* 183:1394-1395; Ashwood-Smith, 1961, *Nature* 190:1204-1205), глицерин, поливинилпирролидин (Rinfret, 1960, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85:576), полиэтиленгликоль (Sloviter and Ravdin, 1962, *Nature* 196:548), альбумин, декстран, сахарозу, этиленгликоль, и-эритрит, D-рибит, D-маннит (Rowe et al., 1962, *Fed. Proc.* 21:157), D-сорбит, и-инозит, D-лактозу, холинхлорид (Bender et al., 1960, *J. Appl. Physiol.* 15:520), аминокислоты (Phan The Tran and Bender, 1960, *Exp. Cell Res.* 20:651), метанол, ацетамид, глицерина моноацетат (Lovelock, 1954, *Biochem. J.* 56:265) и неорганические соли (Phan The Tran and Bender, 1960, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104:388; Phan The Tran and Bender, 1961, в *Radiobiology, Proceedings of the Third Australian Conference on Radiobiology*, ред. Иbery, Butterworth, London, стр. 59). В конкретных вариантах осуществления можно использовать DMSO. Добавление плазмы (например, в концентрации 20-25%) может увеличивать защитные эффекты DMSO. После добавления DMSO, клетки можно держать при 0°C до заморозки, поскольку концентрация DMSO 1% может быть токсичной при температурах выше 4°C.

При криосохранении клеток, низкая контролируемая скорость охлаждения может быть решающей, и различные криозащитные средства (Rapatz et al., 1968, *Cryobiology* 5(1): 18-25) и различные типы клеток имеют различные оптимальные скорости охлаждения (об эффектах скорости охлаждения, оказываемых на выживаемость стволовых клеток и их трансплантационный потенциал см., например, в Rowe and Rinfret, 1962, *Blood* 20:636; Rowe, 1966, *Cryobiology* 3(1):12-18; Lewis, et al., 1967, *Transfusion* 7(1):17-32; и Mazur, 1970, *Science* 168:939-949). Теплота фазы плавления, где вода превращается в лед, должна быть минимальной. Процедуру охлаждения можно осуществлять с использованием, например, программируемого замораживающего устройства или процедуры с метаноловой ванной. Программируемые замораживающие аппараты делают возможным определение оптимальных скоростей охлаждения и облегчают стандартное воспроизводимое охлаждение.

В конкретных вариантах осуществления обработанные DMSO клетки можно предварительно охлаждать на льду и переносить в лоток, содержащий охлажденный метанол, который помещают, в свою очередь, в механический холодильник (например, Haggis или Revco) при -80°C. Измерения терпарой в метаноловой ванне и образцах показывают скорость охлаждения от 1° до 3°C/мин могут быть предпочтительными. После по меньшей мере двух часов образцы могут достигать температуры -80°C, и их можно помещать непосредственно в жидкий азот (-196°C).

После тщательной заморозки, клетки можно быстро переносить в сосуд для длительного криогенного хранения. В конкретных вариантах осуществления образцы можно хранить криогенно в жидком азоте (-196°C) или пару (-1°C). Такому хранению способствует доступность высоко эффективных холодильников на жидком азоте.

Дополнительные факторы и процедуры для манипуляций, криосохранения и длительного хранения клеток можно найти в следующих образцовых источниках: патенты США №№ 4199022; 3753357; и 4559298; Gorin, 1986, *Clinics In Haematology* 15(1):19-48; Bone-Marrow Conservation, Culture and Transplantation, Proceedings of a Panel, Moscow, July 22-26, 1968, International Atomic Energy Agency, Vienna, стр. 107-186; Livesey and Linner, 1987, *Nature* 327:255; Linner et al., 1986, *J. Histochem. Cytochem.* 34(9):1123-1135; Simone, 1992, *J. Parenter. Sci. Technol.* 46(6):226-32).

После криосохранения, замороженные клетки можно оттаивать для использования в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. Замороженные клетки предпочтительно оттаивают быстро и остужают сразу после оттаивания. В конкретных вариантах осуществления флакон, содержащий замороженные клетки, можно погружать вплоть по его шейку в теплую водяную баню; мягкое вращение обеспечивает перемешивание клеточной суспензии по мере ее оттаивания и повышает перенос тепла от теплой воды ко внутренней ледяной массе. Как только лед полностью расплавлен, флакон можно незамедлительно помещать на лед.

В конкретных вариантах осуществления можно использовать способы для того, чтобы предотвратить слеживание клеток во время оттаивания. Образцовые способы включают: до и/или после заморозки добавление ДНКазы (Spitzer et al., 1980, *Cancer* 45:3075-3085), низкомолекулярного декстрана и цитрата, гидроксиптилкрахмала (Stiff et al., 1983, *Cryobiology* 20:17-24) и т.д.

Как понятно специалисту в данной области, если используют криозащитное средство, которое является токсичным для человека, его следует удалять перед терапевтическим использованием. DMSO не обладает серьезной токсичностью.

Образцовые носители и способы введения клеток описаны на страницах 14-15 публикации патента США № 2010/0183564. Дополнительные фармацевтические носители описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21-е изд., ред. David B. Troy, Lippicott Williams & Wilkins (2005).

В конкретных вариантах осуществления клетки можно собирать из среды для культивирования и промывать и концентрировать в носителе в терапевтически-эффективном количестве. Образцовые носители включают солевой раствор, буферный солевой раствор, физиологический раствор, воду, раствор Хэнкса, раствор Рингера, Nonnosol-R (Abbott Labs), Plasma-Lyte A® (Baxter Laboratories, Inc., Morton

Grove, IL), глицерин, этанол и их сочетания.

В конкретных вариантах осуществления носители могут быть с добавлением сывороточного альбумина человека (HSA) или других компонентов сыворотки человека или эмбриональной телячьей сыворотки. В конкретных вариантах осуществления носитель для инфузии включает буферный солевой раствор с 5% HAS или декстрозой. Дополнительные изотонические средства включают многоатомные сахароспирты, в том числе трехатомные или более высокие сахароспирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит или маннит.

Носители могут включать буферные средства, такие как цитратные буферы, сукцинатные буферы, тартратные буферы, фумаратные буферы, глюконатные буферы, оксалатные буферы, лактатные буферы, ацетатные буферы, фосфатные буферы, гистидиновые буферы и/или триметиламиновые соли.

Стабилизаторы относятся к обширной категории эксципиентов, которые могут находиться в функциональном диапазоне от объемобразующего средства до добавки, которая помогает предотвращать прилипание клеток к стенкам контейнера. Типичные стабилизаторы могут включать многоатомные сахароспирты; аминокислоты, такие как аргинин, лизин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аланин, орнитин, L-лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота и третонин; органические сахара или сахароспирты, такие как лактоза, трегалоза, стахиоза, маннит, сорбит, ксилит, рибит, миоинозит, галактит, глицерин и циклитолы, такие как инозит; PEG; аминокислотные полимеры; серусодержащие восстанавливающие средства, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низко молекулярные полипептиды (т.е. <10 остатков); белки, такие как HSA, бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды, такие как ксилоза, манноза, фруктоза и глюкоза; дисахариды, такие как лактоза, мальтоза и сахароза; трисахариды, такие как раффиноза и полисахариды, такие как декстран.

В случае необходимости или пользы, клеточные композиции могут включать местный анестетик, такой как лидокаин, чтобы облегчать боль в месте инъекции.

Образцовые консерванты включают фенол, бензиловый спирт, м-крезол, метилпарабен, пропилпарабен, октадецилдиметилбензиламмония хлорид, галогениды бензалкония, хлорид гексаметония, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол и 3-пентанол.

Терапевтически эффективные количества клеток в клеточных композициях могут составлять больше чем  $10^2$  клеток, больше чем  $10^3$  клеток, больше чем  $10^4$  клеток, больше чем  $10^5$  клеток, больше чем  $10^6$  клеток, больше чем  $10^7$  клеток, больше чем  $10^8$  клеток, больше чем  $10^9$  клеток, больше чем  $10^{10}$  клеток или больше чем  $10^{11}$ .

В клеточных композициях, раскрытых в настоящем описании, клетки в целом находятся в объеме литра или меньше, 500 мл или меньше, 250 мл или меньше или 100 мл или меньше. Таким образом, плотность вводимых клеток обычно составляет больше чем  $10^4$  клеток/мл,  $10^7$  клеток/мл или  $10^8$  клеток/мл.

Клеточные композиции, раскрытые в настоящем описании, можно получать для введения, например, посредством инъекции, инфузии, перфузии или лаважа. Клеточные композиции дополнительно можно формулировать для костномозговой, внутривенной, внутриартериальной, внутрикожной, внутриартериальной, внутриузловой, внутрилимфатической, интраперитонеальной, внутрь повреждения, внутрипростатной, интравагинальной, интаректальной, топической, интратекальной, внутриопухольной, внутримышечной, интравезикулярной и/или подкожной инъекции.

Композиции для способов использования *in vivo*. Наноносители, раскрытые в настоящем описании, также можно формулировать в композиции для прямого введения субъекту, где селективное направленное воздействие и модификация наскок-и-отход происходит *in vivo* (как понятно специалисту в данной области, подходы *ex vivo* и *in vivo*, описанные в настоящем описании, не являются взаимоисключающими, и их можно комбинировать на практике). Эти композиции обозначают в настоящем описании как композиции на основе наноносителя.

В конкретных вариантах осуществления наноносители предоставляют в качестве части композиции на основе наноносителя, которая может содержать по меньшей мере 0,1% мас./об. или мас./мас. наноносителей; по меньшей мере 1% мас./об. или мас./мас. наноносителей; по меньшей мере 10% мас./об. или мас./мас. наноносителей; по меньшей мере 20% мас./об. или мас./мас. наноносителей; по меньшей мере 30% мас./об. или мас./мас. наноносителей; по меньшей мере 40% мас./об. или мас./мас. наноносителей; по меньшей мере 50% мас./об. или мас./мас. наноносителей; по меньшей мере 60% мас./об. или мас./мас. наноносителей; по меньшей мере 70% мас./об. или мас./мас. наноносителей; по меньшей мере 80% мас./об. или мас./мас. наноносителей; по меньшей мере 90% мас./об. или мас./мас. наноносителей; по меньшей мере 95% мас./об. или мас./мас. наноносителей; или по меньшей мере 99% мас./об. или мас./мас. наноносителей.

Композиции на основе наноносителя, раскрытые в настоящем описании, можно формулировать для введения посредством инъекции, ингаляции, инфузии, перфузии, лаважа или глотания. Композиции на основе наноносителя, раскрытые в настоящем описании, дополнительно можно формулировать для внутривенного, внутрикожного, внутриартериального, внутриузлового, внутрилимфатического, интраперитонеального, внутрь повреждения, внутрипростатного, интравагинального, интаректального, топиче-

ского, интратекального, внутриопухолевого, внутримышечного, интравезикулярного, перорального и/или подкожного введения и более конкретно посредством внутривенной, внутрикожной, внутриартериальной, внутриузловой, внутрилимфатической, интраперитонеальной, внутрь повреждения, внутрипростатной, интравагинальной, интравезикулярной, топической, интратекальной, внутриопухоловой, внутримышечной, интравезикулярной, оральной и/или подкожной инъекции.

Для инъекции композиции на основе наноносителя можно формулировать в виде водных растворов, например, в буферах, включая раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический раствор. Водные растворы могут содержать вспомогательные средства, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Альтернативно, состав может быть в лиофилизированной и/или порошкообразной форме для разведения подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой, перед использованием.

Для орального введения композиции на основе наноносителя можно формулировать в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и т. п. Для оральных твердых составов, например, таких как порошки, капсулы и таблетки, подходящие эксципиенты включают связывающие средства (трагакантовая, аравийская камедь, кукурузный крахмал, желатин), наполнители, такие как сахара, например, лактоза, сахароза, маннит и сорбит; фосфат дикальция, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлозу, карбонат магния; препараты целлюлозы, такие как кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовую камедь, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия и/или поливинилпирролидон (PVP); гранулирующие средства; и связывающие средства. При желании, можно добавлять средства для улучшения распадаемости, такие как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота, сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или их соль, такую как альгинат натрия. При желании, твердые дозированные формы можно покрывать сахаром или кишечнорастворимой оболочкой с использованием стандартных способов. Также можно использовать ароматизаторы, такие как перечная мята, масла грушанки, вишневым ароматизатор, апельсиновый ароматизатор и т.д.

Для введения посредством ингаляции, композиции на основе наноносителя можно формулировать в виде аэрозольных спреев из упаковки под давлением или небулайзера, с использованием подходящего пропеллента, например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого подходящего газа. В случае аэрозоля под давлением единицу дозирования можно определять посредством предоставления клапана для того, чтобы доставлять отмеренное количество. Для использования в ингаляторе или инсуффляторе можно формулировать капсулы и картриджи из желатина, содержащие порошковую смесь из терапевтического средства и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Любой состав композиции на основе наноносителя, раскрытый в настоящем описании, может благоприятно содержать любые другие фармацевтически приемлемые носители, которые включают те, которые не вызывают значительные нежелательные, аллергические или другие неблагоприятные реакции, которые перевешивают пользу от введения, будь то для исследовательского, профилактического и/или терапевтического лечения. Образцовые фармацевтически приемлемые носители и составы раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., Mack Printing Company, 1990. Кроме того, можно получать составы, которые отвечают стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как того требует United States FDA Office of Biological Standards и/или другие релевантные иностранные регулирующие органы.

Образцовые обычно используемые фармацевтически приемлемые носители включают любые и все объемобразующие средства или наполнители, растворители или соразтворители, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные средства, антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метионин, витамин Е), консерванты, изотонические средства, средства, задерживающие абсорбцию, соли, стабилизаторы, буферные средства, хелатирующие средства (например, EDTA), гели, связывающие средства, средства для улучшения распадаемости и/или смазывающие средства.

Образцовые буферные средства включают цитратные буферы, сукцинатные буферы, тартратные буферы, фумаратные буферы, глюконатные буферы, оксалатные буферы, лактатные буферы, ацетатные буферы, фосфатные буферы, гистидиновые буферы и/или триметиламиновые соли.

Образцовые консерванты включают фенол, бензиловый спирт, м-крезол, метилпарабен, пропилпарабен, октадецилдиметилбензиламмония хлорид, галогениды бензалкония, хлорид гексаметония, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол и 3-пентанол.

Образцовые изотонические средства включают многоатомные сахароспирты, в том числе трехатомные или более высокие сахароспирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит или маннит.

Образцовые стабилизаторы включают органические сахара, многоатомные сахароспирты, полиэтиленгликоль; серусодержащие восстанавливающие средства, аминокислоты, низкомолекулярные полипептиды, белки, иммуноглобулины, гидрофильные полимеры или полисахариды.

Композиции на основе наноносителя также можно формулировать в виде препаратов депо. Препараты депо можно формулировать с использованием подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменных смол, или в виде умеренно

растворимых производных, например, в виде умеренно растворимых солей.

Дополнительно, композиции на основе наноносителя можно формулировать в виде систем с замедленным высвобождением, где используют полупроницаемые матрицы из твердых полимеров, содержащие по меньшей мере один активный ингредиент. Созданы различные материалы с замедленным высвобождением, которые хорошо известны средним специалистам в данной области. Системы с замедленным высвобождением, в зависимости от их химической природы, могут высвобождать активные ингредиенты после введения в течение нескольких недель вплоть до более чем 100 суток.

Способы использования. Способы, раскрытые в настоящем описании, включают лечение субъектов (человека, ветеринарных животных, сельскохозяйственных животных и исследовательских животных) с использованием клеточных композиций и композиций на основе наноносителя, раскрытых в настоящем описании. Как указано, композиции позволяют лечить многие различные состояния, в диапазоне от злокачественной опухоли до инфекционного заболевания. Композиции также можно использовать в качестве адьювантов вакцин.

Лечение субъектов включает доставку терапевтически эффективных количеств. Терапевтически эффективные количества могут обеспечивать эффективные количества, профилактическое лечение и/или терапевтическое лечение.

"Эффективное количество" представляет собой количество соединения, которое необходимо, чтобы достигать желаемого физиологического изменения у субъекта. Эффективные количества часто вводят для исследовательских целей. Эффективные количества, раскрытые в настоящем описании, изменяют фенотип клетки, в качестве эффекта редактирования генов или экспрессии изменяющего фенотип белка.

"Профилактическое лечение" включает лечение, вводимое субъекту, который не проявляет признаков или симптомов заболевания или состояния или проявляет только ранние признаки или симптомы заболевания или состояния, так что лечение вводят с целью уменьшения, предотвращения или снижения риска дальнейшего развития заболевания или состояния. Таким образом, профилактическое лечение выполняет функцию предупредительного лечения заболевания или нарушения. Вакцины представляют собой один из примеров профилактического лечения.

В конкретных вариантах осуществления профилактическое лечение вводят для лечения вирусных инфекций, таких как HIV. Например, композиции можно вводить профилактически субъектам, которые имеют риск развития вирусной инфекции или которые были экспонированы для вируса, чтобы предотвращать, снижать или задерживать развитие вирусной инфекции или заболевания. Например, композиции можно вводить субъекту, который вероятно был экспонирован для вируса (например, HIV), или субъекту, который имеет высокий риск экспозиции для вируса.

"Терапевтическое лечение" включает лечение, вводимое субъекту, который проявляет симптомы или признаки заболевания или состояния, и его вводят субъекту с целью уменьшения или устранения этих признаков или симптомов заболевания или состояния.

Профилактическое и терапевтическое лечение не обязательно предотвращать или излечивать заболевание или состояние, но также может обеспечивать частичный эффект.

В контексте злокачественных опухолей, терапевтически эффективные количества могут снижать число опухолевых клеток, снижать число метастазов, снижать объем опухоли, увеличивать ожидаемую продолжительность жизни, индуцировать апоптоз клеток злокачественной опухоли, индуцировать гибель злокачественных клеток, индуцировать химио- или радиочувствительность у клеток злокачественной опухоли, ингибировать ангиогенез около клеток злокачественной опухоли, ингибировать пролиферацию клеток злокачественной опухоли, ингибировать опухолевый рост, предотвращать метастазы, продлевать жизнь субъекта, снижать боль, ассоциированную со злокачественной опухолью, снижать число метастазов и/или снижать рецидивирование или повторное возникновение злокачественной опухоли после лечения.

В контексте вирусов, терапевтически эффективные количества могут снижать число инфицированных вирусом клеток и снижать один или более симптомов, связанных с вирусной инфекцией, таких как лихорадка, озноб, рвота, боль в суставах и т.д.

В контексте HIV, терапевтически эффективные количества позволяют снижать число HIV-инфицированных клеток, увеличивать число Т-клеток у субъекта, снижать заболеваемость, частоту или тяжесть инфекций, увеличивать ожидаемую продолжительность жизни, продлевать жизнь субъекта и/или снижать HIV-ассоциированную боль или нарушение когнитивных функций.

В контексте адьювантов вакцин, вакцины увеличивают иммунитет субъекта против конкретного заболевания, и адьювант вакцины потенцирует и/или продлевает это увеличение. Специалист в данной области примет во внимание, что иммунная система в целом способна производить врожденный иммунный ответ и адаптивный иммунный ответ. Врожденный иммунный ответ в целом можно охарактеризовать как не являющийся по существу антигенспецифическим и/или не создающий иммунную память. Адаптивный иммунный ответ можно охарактеризовать как являющийся по существу антигенспецифическим, созревающий с течением времени (например, увеличение аффинности и/или avidности к антигену) и в целом способный создавать иммунологическую память. Даже несмотря на то, что можно выявить эти и другие функциональные различия между врожденным и адаптивным иммунитетом, специалист в дан-

ной области примет во внимание, что врожденная и адаптивная иммунные системы могут быть интегрированными и, следовательно, могут действовать совместно.

Для введения, терапевтически эффективные количества (также обозначаемые в настоящем описании как дозы) можно изначально оценивать на основании результатов анализов *in vitro* и/или исследований на животных моделях. Такую информацию можно использовать для более точного определения эффективных доз у субъектов, представляющих интерес.

Фактическое количество дозы, вводимое конкретному субъекту, может определять врач, ветеринар или исследователь, учитывая параметры, такие как физические и физиологические факторы, в том числе мишень, массу тела, тяжесть состояния, тип заболевания, предыдущие или сопутствующие терапевтические вмешательства, идиопатия субъекта и путь введения.

Эффективные дозы клеточных композиций предоставлены в другом месте в настоящем описании. Эффективные дозы композиций на основе наноносителя могут включать от 0,1 до 5 мкг/кг или от 0,5 до 1 мкг/кг. В других примерах доза композиции на основе наноносителя может включать, например, 1 мкг/кг, 10 мкг/кг, 20 мкг/кг, 30 мкг/кг, 40 мкг/кг, 50 мкг/кг, 60 мкг/кг, 70 мкг/кг, 80 мкг/кг, 90 мкг/кг, 100 мкг/кг, 150 мкг/кг, 200 мкг/кг, 250 мкг/кг, 350 мкг/кг, 400 мкг/кг, 450 мкг/кг, 500 мкг/кг, 550 мкг/кг, 600 мкг/кг, 650 мкг/кг, 700 мкг/кг, 750 мкг/кг, 800 мкг/кг, 850 мкг/кг, 900 мкг/кг, 950 мкг/кг, 1000 мкг/кг, от 0,1 до 5 мг/кг или от 0,5 до 1 мг/кг. В других неограничивающих примерах доза может включать 1 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 60 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг, 90 мг/кг, 100 мг/кг, 150 мг/кг, 200 мг/кг, 250 мг/кг, 350 мг/кг, 400 мг/кг, 450 мг/кг, 500 мг/кг, 550 мг/кг, 600 мг/кг, 650 мг/кг, 700 мг/кг, 750 мг/кг, 800 мг/кг, 850 мг/кг, 900 мг/кг, 950 мг/кг, 1000 мг/кг или больше.

Терапевтически эффективных количеств можно достигать посредством введения одной или более доз в ходе схемы лечения (например, ежедневно, через день, каждые 3 суток, каждые 4 суток, каждые 5 суток, каждые 6 суток, еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели, ежемесячно, каждые 2 месяца, каждые 3 месяца, каждые 4 месяца, каждые 5 месяцев, каждые 6 месяцев, каждые 7 месяцев, каждые 8 месяцев, каждые 9 месяцев, каждые 10 месяцев, каждые 11 месяцев или ежегодно).

Если не указано иное, при практической реализации настоящего раскрытия можно использовать общепринятые способы из иммунологии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии и рекомбинантной ДНК. Эти способы описаны в следующих публикациях. См., например, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-е изд. (1989); F. M. Ausubel, et al., ред., *Current Protocols in Molecular Biology*, (1987); серию *Methods IN Enzymology* (Academic Press, Inc.); M. MacPherson, et al., *PCR: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press (1991); MacPherson et al., ред. *PCR 2: Practical Approach*, (1995); Harlow and Lane, ред. *Antibodies, A Laboratory Manual*, (1988); и R. I. Freshney, ред. *Animal Cell Culture* (1987).

Информацию о последовательностях, предоставленную в публичных базах данных, можно использовать для того, чтобы идентифицировать последовательности генов для направленного воздействия и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие изменяющие фенотип белки, как раскрыто в настоящем описании. Образцовые последовательности предоставлены на фиг. 11.

Также включены варианты последовательностей, которые раскрыты и упомянуты в настоящем описании. Варианты белков могут включать те, которые имеют одну или более консервативных аминокислотных замен. Как используют в настоящем описании, "консервативная замена" включает замену, встречающуюся в одной из следующих групп консервативных замен: группа 1: аланин (Ala), глицин (Gly), серин (Ser), треонин (Thr); группа 2: аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu); группа 3: аспарагин (Asn), глутамин (Gln); группа 4: аргинин (Arg), лизин (Lys), гистидин (His); группа 5: изолейцин (Ile), лейцин (Leu), метионин (Met), валин (Val); и группа 6: фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr), триптофан (Trp).

Дополнительно аминокислоты можно группировать в группы консервативных замен по схожей функции или химической структуре или композиции (например, кислые, основные, алифатические, ароматические, серусодержащие). Например, алифатическая группировка может включать, для целей замены, Gly, Ala, Val, Leu и Ile. Другие группы, содержащие аминокислоты, которые считают консервативными заменами друг для друга, включают: серусодержащие: Met и цистеин (Cys); кислые: Asp, Glu, Asn и Gln; небольшие алифатические, неполярные или слегка полярные остатки: Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды: Asp, Asn, Glu и Gln; полярные, положительно заряженные остатки: His, Arg и Lys; большие алифатические, неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val и Cys; и большие ароматические остатки: Phe, Tyr и Trp. Дополнительная информация находится в Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company.

Как указано в другом месте, варианты последовательностей генов могут включать варианты с оптимизированными кодонами, полиморфизмы последовательностей, сплайсинговые варианты и/или мутации, которые не влияют на функцию кодируемого продукта в статистически значимой степени.

Варианты последовательностей белков, нуклеиновых кислот и генов, которые раскрыты в настоящем описании, также включают последовательности с по меньшей мере 70% идентичностью последовательностей, 80% идентичностью последовательностей, 85% идентичностью последовательностей, 90% идентичностью последовательностей, 95% идентичностью последовательностей, 96% идентичностью

последовательностей, 97% идентичностью последовательностей, 98% идентичностью последовательностей или 99% идентичностью последовательностей с последовательностями белков, нуклеиновых кислот или генов, которые раскрыты в настоящем описании.

"% идентичности последовательностей" относится к родству между двумя или больше последовательностями, как определяют посредством сравнения последовательностей. В данной области "идентичность" также обозначает степень родства последовательностей между последовательностями белков, нуклеиновых кислот или генов, как определяют по совпадениям между строками таких последовательностей. "Идентичность" (часто обозначаемую как "сходство") можно легко вычислять известными способами, в том числе (но не ограничиваясь этим) теми, которые описаны в: Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ред.) Oxford University Press, NY (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ред.) Academic Press, NY (1994); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., ред.) Humana Press, NJ (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (Von Heijne, G., ред.) Academic Press (1987); and Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., ред.) Oxford University Press, NY (1992). Разработаны предпочтительные способы определения идентичности для получения наилучшего совпадения между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности и сходства закодированы в общедоступных компьютерных программах. Выравнивание последовательностей и вычисления процента идентичности можно осуществлять с использованием программы Megalign из биоинформационного вычислительного пакета LASERGENE (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin). Множественное выравнивание последовательностей также можно осуществлять с использованием способа выравнивания Clustal (Higgins and Sharp CABIOS, 5, 151-153 (1989) с параметрами по умолчанию (GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=10). Релевантные программы также включают пакет программ GCG (Wisconsin Package версии 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin); BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin); и программу FASTA, содержащую алгоритм Smith-Waterman (Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor(s): Suhai, Sandor. Publisher: Plenum, New York, N.Y. В рамках контекста этого раскрытия понятно, что когда программное обеспечение для анализа последовательностей используют для анализа, результаты анализа основаны на "значениях по умолчанию" в упомянутой программе. Как используют в настоящем описании "значения по умолчанию" обозначают любой набор значений или параметров, который исходно загружают с программным обеспечением при первой инициализации. Образцовые варианты осуществления.

1. Способ получения выбранной популяции клеток гематопоэтического происхождения для введения субъекту, который включает

получение образца от субъекта, где образец содержит гетерогенную смесь клеток, включая выбранную популяцию клеток гематопоэтического происхождения;

экспонирование образца для синтетического наноносителя, содержащего:

(i) синтетическую нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в положительно заряженный носитель, где синтетическая нуклеиновая кислота кодирует средство редактирования генов или изменяющий фенотип белок;

(ii) нейтрально или отрицательно заряженное покрытие на внешней поверхности носителя; и

(iii) направляющий на выбранную клетку лиганд, выступающий с поверхности покрытия;

где экспонирование ведет к избирательной доставке наноносителя в выбранную популяцию клеток, что ведет к модификации клеток в выбранной популяции клеток; и размножению клеток в образце;

тем самым получая выбранную популяцию клеток для введения субъекту.

2. Способ по варианту осуществления 1, в котором размноженные клетки в образце включают модифицированные клетки выбранной популяции клеток.

3. Способ по варианту осуществления 1 или 2, который дополнительно включает формулирование полученной выбранной популяции клеток в клеточной композиции.

4. Способ по варианту осуществления 3, который дополнительно включает введение клеточной композиции субъекту.

5. Способ по любому из вариантов осуществления 1-4, в котором нет стадий выделения или только ограниченные стадии выделения проводят для увеличения процентной доли выбранной популяции клеток в гетерогенной смеси клеток перед экспонированием.

6. Способ по любому из вариантов осуществления 1-5, в котором синтетическая нуклеиновая кислота кодирует средство редактирования генов, выбранное из подобных активатору транскрипции эф-факторных нуклеаз (TALEN); megaTAL; и/или нуклеаз с цинковыми пальцами.

7. Способ по варианту осуществления 6, в котором синтетическая нуклеиновая кислота кодирует megaTAL с SEQ ID NO: 1.

8. Способ по любому из вариантов осуществления 1-7, в котором средство редактирования генов разрушает эндогенные гены, кодирующие фосфатазу Shp-1, рецептор PD1, T-клеточные рецепторы (TCR), CCR5 и/или CXCR4.

9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, в котором средство редактирования генов разрушает эндогенные гены, кодирующие  $\alpha$ -цепи TCR.

10. Способ по любому из вариантов осуществления 1-9, в котором синтетическая нуклеиновая кислота кодирует изменяющий фенотип белок, выбранный из фактора транскрипции, киназы и/или рецептора клеточной поверхности.

11. Способ по варианту осуществления 10, в котором изменяющий фенотип белок выбирают из FOXO1, LKB1, TCF7, EOMES, ID2, TERT, CCR2b и/или CCR4.

12. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает лимфоциты в гетерогенной популяции клеток.

13. Способ по варианту осуществления 12, в котором гетерогенная популяция клеток представляет собой клеточную культуру *ex vivo*.

14. Способ по варианту осуществления 12, в котором гетерогенная популяция клеток находится *in vivo*.

15. Способ по любому из вариантов осуществления 1-14, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает Т-клетки, НК клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, В-клетки, гематопозитические стволовые клетки или их сочетание.

16. Способ по любому из вариантов осуществления 1-15, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из лиганда для рецептора лимфоцита, антитела для рецептора лимфоцита, пептидного аптамера для рецептора лимфоцита, аптамера из нуклеиновой кислоты для рецептора лимфоцита, шпигельмера для рецептора лимфоцита или их сочетания.

17. Способ по любому из вариантов осуществления 1-16, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает мотивы Т-клеточного рецептора;  $\alpha$ -цепи Т-клеток;  $\beta$ -цепи Т-клеток;  $\gamma$ -цепи Т-клеток;  $\delta$ -цепи Т-клеток;

CCR7; CD1a; CD1b;

CD1c; CD1d; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b; CD11c; CD16; CD19;

CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35; CD39; CD40; CD45RA;

CD45RO; CD46, CD52; CD56; CD62L; CD68; CD69; CD80; CD86; CD95;

CD101; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB); CD148; CD163; CD209;

DEC-205; F4/80; IL-4R $\alpha$ ; Sca-1; CTLA-4; GITR; GARP; LAP;

гранзим В; LFA-1; или трансферриновый рецептор.

18. Способ по любому из вариантов осуществления 1-17, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает

CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CCR7; CD3; CD4; CD5; CD8;

CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD35; CD40; CD45RA;

CD45RO; CD46; CD52; CD69; CD62L; CD80; CD95; CD127; CD137;

CD209; или DEC-205.

19. Способ по любому из вариантов осуществления 1-18, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из антитела к  $\alpha$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\beta$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\gamma$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\delta$ -цепям Т-клеток; антитела к CCR7; антитела к CD1a; антитела к CD1b; антитела к CD1c; антитела к CD1d; антитела к CD3; антитела к CD4; антитела к CD5; антитела к CD7; антитела к CD8; антитела к CD11b; антитела к CD11c; антитела к CD16; антитела к CD19; антитела к CD20; антитела к CD21; антитела к CD22; антитела к CD25; антитела к CD28; антитела к CD34; антитела к CD35; антитела к CD39; антитела к CD40; антитела к CD45RA; антитела к CD45RO; антитела к CD46; антитела к CD52; антитела к CD56; антитела к CD62L; антитела к CD68; антитела к CD69; антитела к CD80; антитела к CD86; антитела к CD95; антитела к CD101; антитела к CD117; антитела к CD127; антитела к CD133; антитела к CD137 (4-1BB); антитела к CD148; антитела к CD163; антитела к CD209; антитела к DEC-205; антитела к F4/80; антитела к IL-4R $\alpha$ ; антитела к Sca-1; антитела к CTLA-4; антитела к GITR; антитела к GARP; антитела к LAP; антитела к гранзиму В; антитела к LFA-1; или антитела к трансферриновому рецептору.

20. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, в котором связывающий домен состоит из или состоит по существу из scFv фрагмента антитела к  $\alpha$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\beta$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\gamma$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\delta$ -цепям Т-клеток; антитела к CCR7; антитела к CD1a; антитела к CD1b; антитела к CD1c; антитела к CD1d; антитела к CD3; антитела к CD4; антитела к CD5; антитела к CD7; антитела к CD8; антитела к CD11b; антитела к CD11c; антитела к CD16; антитела к CD19; антитела к CD20; антитела к CD21; антитела к CD22; антитела к CD25; антитела к CD28; антитела к CD34; антитела к CD35; антитела к CD39; антитела к CD40; антитела к CD45RA; антитела к CD45RO; антитела к CD46; антитела к CD52; антитела к CD56; антитела к CD62L; антитела к CD68; антитела к CD69; антитела к CD80; антитела к CD86; антитела к CD95; антитела к CD101; антитела к CD117; антитела к CD127; антитела к CD133; антитела к CD137 (4-1BB); антитела к CD148; антитела к CD163; антитела к CD209;

антитела к DEC-205; антитела к F4/80; антитела к IL-4R $\alpha$ ; антитела к Sca-1; антитела к CTLA-4; антитела к GITR; антитела к GARP; антитела к LAP; антитела к гранзиму B; антитела к LFA-1; или антитела к трансферриновому рецептору.

21. Способ по любому из вариантов осуществления 1-20, в котором синтетическая нуклеиновая кислота представляет собой синтетическую мРНК.

22. Способ по любому из вариантов осуществления 1-21, в котором носитель содержит положительно заряженный липид или полимер.

23. Способ по варианту осуществления 22, в котором положительно заряженный полимер включает сложный поли( $\beta$ -аминоэфир, поли(L-лизин), поли(этиленмин) (PEI), дендримеры поли-(амидоаминов) (РАМАМ), сополимеры аминов и сложных эфиров, поли(диметиламиноэтилметакрилат) (PDMAEMA), хитозан, поли-(L-лактид-ко-L-лизин), поли[ $\alpha$ -(4-аминобутил)-L-гликолевую кислоту] (PAGA) или полимер сложного эфира 4-гидрокси-L-пролина (PHP).

24. Способ по любому из вариантов осуществления 1-23, в котором покрытие содержит нейтрально или отрицательно заряженный липид или полимер.

25. Способ по варианту осуществления 24, в котором нейтрально или отрицательно заряженное покрытие содержит полиглутаминовую кислоту (PGA), поли(акриловую кислоту), альгиновую кислоту или холестерилгемисукцинат/1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин.

26. Способ по варианту осуществления 24 или 25, в котором нейтрально или отрицательно заряженное покрытие содержит цвиттер-ионный полимер.

27. Способ по любому из вариантов осуществления 24-26, в котором нейтрально или отрицательно заряженное покрытие содержит липосому.

28. Способ по варианту осуществления 27, в котором липосома содержит 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан (DOTAP), 1,2-ди-О-октадецил-3-триметиламмоний-пропан (DOTMA), 3 $\beta$ -[N-(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерин (DC-Chol), диоктадецил-амидоглицилспермин (DOGS), холестерин, 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE) или 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC).

29. Способ по любому из вариантов осуществления 1-28, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает CD4 и/или CD8.

30. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из антитела к CD4 и/или антитела к CD8.

31. Способ по любому из вариантов осуществления 1-30, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из scFv фрагмента антитела к CD4 и/или антитела к CD8.

32. Способ по любому из вариантов осуществления 1-31, в котором носитель содержит сложный поли( $\beta$ -аминоэфир).

33. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, в котором покрытие содержит полиглутаминовую кислоту (PGA).

34. Способ по любому из вариантов осуществления 1-33, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из антитела к CD4 и/или антитела к CD8; носитель содержит сложный поли( $\beta$ -аминоэфир); и покрытие содержит полиглутаминовую кислоту (PGA).

35. Способ получения клеток для лечения субъекта, который включает:

получение лимфоцитов у субъекта;

объединение лимфоцитов с синтетическим наноносителем, содержащим:

(i) синтетическую нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в положительно заряженный носитель, где синтетическая нуклеиновая кислота кодирует средство редактирования генов или изменяющий фенотип белок;

(ii) нейтрально или отрицательно заряженное покрытие на внешней поверхности носителя; и

(iii) направляющий на выбранную клетку лиганд, выступающий с поверхности покрытия;

в котором после объединения наноносители избирательно встраиваются в лимфоциты так, что лимфоциты временно экспрессируют нуклеиновую кислоту.

36. Способ по варианту осуществления 35, который дополнительно включает размножение лимфоцитов.

37. Способ по варианту осуществления 35 или 36, который дополнительно включает формулирование лимфоцитов в клеточной композиции.

38. Способ по любому из вариантов осуществления 35-37, в котором нет стадий выделения или только ограниченные стадии выделения проводят для увеличения процентной доли выбранной популяции клеток в гетерогенной смеси клеток перед экспонированием.

39. Способ по любому из вариантов осуществления 35-38, в котором синтетическая нуклеиновая кислота кодирует средство редактирования генов, выбранное из подобных активатору транскрипции эф-фекторных нуклеаз (TALEN); megaTAL; и/или нуклеаз с цинковыми пальцами.

40. Способ по любому из вариантов осуществления 35-39, в котором синтетическая нуклеиновая

кислота кодирует megaTAL с SEQ ID NO: 1.

41. Способ по любому из вариантов осуществления 35-40, в котором средства редактирования генов разрушают эндогенные гены, кодирующие фосфатазу Shp-1, рецептор PD1, Т-клеточные рецепторы (TCR), CCR5 и/или CXCR4.

42. Способ по любому из вариантов осуществления 35-41, в котором средства редактирования генов разрушают эндогенные гены, кодирующие  $\alpha$ -цепи TCR.

43. Способ по любому из вариантов осуществления 35-42, в котором синтетическая нуклеиновая кислота кодирует изменяющий фенотип белок, выбранный из фактора транскрипции, киназы и/или рецептора клеточной поверхности.

44. Способ по варианту осуществления 43, в котором изменяющий фенотип белок выбирают из FOXO1, LKB1, TCF7, EOMES, ID2, TERT, CCR2b и/или CCR4.

45. Способ по любому из вариантов осуществления 35-44, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает лимфоциты в гетерогенной популяции клеток.

46. Способ по варианту осуществления 45, в котором гетерогенная популяция клеток представляет собой клеточную культуру *ex vivo*.

47. Способ по варианту осуществления 45, в котором гетерогенная популяция клеток находится *in vivo*.

48. Способ по любому из вариантов осуществления 35-47, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает Т-клетки, НК клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, В-клетки, гематопозитические стволовые клетки или их сочетание.

49. Способ по любому из вариантов осуществления 35-48, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из лиганда для рецептора лимфоцита, антитела для рецептора лимфоцита, пептидного аптамера для рецептора лимфоцита, аптамера из нуклеиновой кислоты для рецептора лимфоцита, шпигельмера для рецептора лимфоцита или их сочетания.

50. Способ по любому из вариантов осуществления 35-49, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает мотивы Т-клеточного рецептора;  $\alpha$ -цепи Т-клеток;  $\beta$ -цепи Т-клеток;  $\gamma$ -цепи Т-клеток;  $\delta$ -цепи Т-клеток;

CCR7; CD1a; CD1b;

CD1c; CD1d; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b; CD11c; CD16; CD19;

CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35; CD39; CD40; CD45RA;

CD45RO; CD46; CD52; CD56; CD62L; CD68; CD69; CD80; CD86; CD95;

CD101; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB); CD148; CD163; CD209;

DEC-205; F4/80; IL-4R $\alpha$ ; Sca-1; CTLA-4; GITR; GARP; LAP;

гранзим В; LFA-1; или трансферриновый рецептор.

51. Способ по любому из вариантов осуществления 35-50, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает

CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CCR7; CD3; CD4; CD5; CD8;

CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD35; CD40; CD45RA;

CD45RO; CD46; CD52; CD62L; CD69; CD80; CD95; CD127; CD137;

CD209; или DEC-205.

52. Способ по любому из вариантов осуществления 35-51, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из антитела к  $\alpha$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\beta$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\gamma$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\delta$ -цепям Т-клеток; антитела к CCR7; антитела к CD1a; антитела к CD1b; антитела к CD1c; антитела к CD1d; антитела к CD3; антитела к CD4; антитела к CD5; антитела к CD7; антитела к CD8; антитела к CD11b; антитела к CD11c; антитела к CD16; антитела к CD19; антитела к CD20; антитела к CD21; антитела к CD22; антитела к CD25; антитела к CD28; антитела к CD34; антитела к CD35; антитела к CD39; антитела к CD40; антитела к CD45RA; антитела к CD45RO; антитела к CD46; антитела к CD52; антитела к CD56; антитела к CD62L; антитела к CD68; антитела к CD69; антитела к CD80; антитела к CD86; антитела к CD95; антитела к CD101; антитела к CD117; антитела к CD127; антитела к CD133; антитела к CD137 (4-1BB); антитела к CD148; антитела к CD163; антитела к CD209; антитела к DEC-205; антитела к F4/80; антитела к IL-4R $\alpha$ ; антитела к Sca-1; антитела к CTLA-4; антитела к GITR; антитела к GARP; антитела к LAP; антитела к гранзиму В; антитела к LFA-1; или антитела к трансферриновому рецептору.

53. Способ по любому из вариантов осуществления 35-52, в котором связывающий домен состоит из или состоит по существу из scFv фрагмента антитела к  $\alpha$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\beta$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\gamma$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\delta$ -цепям Т-клеток; антитела к CCR7; антитела к CD1a; антитела к CD1b; антитела к CD1c; антитела к CD1d; антитела к CD3; антитела к CD4; антитела к CD5;

антитела к CD7; антитела к CD8; антитела к CD11b; антитела к CD11c; антитела к CD16; антитела к CD19; антитела к CD20; антитела к CD21; антитела к CD22; антитела к CD25; антитела к CD28; антитела к CD34; антитела к CD35; антитела к CD39; антитела к CD40; антитела к CD45RA; антитела к CD45RO; антитела к CD46; антитела к CD52; антитела к CD56; антитела к CD62L; антитела к CD68; антитела к CD69; антитела к CD80; антитела к CD86; антитела к CD95; антитела к CD101; антитела к CD117; антитела к CD127; антитела к CD133; антитела к CD137 (4-1BB); антитела к CD148; антитела к CD163; антитела к CD209; антитела к DEC-205; антитела к F4/80; антитела к IL-4R $\alpha$ ; антитела к Sca-1; антитела к CTLA-4; антитела к GITR; антитела к GARP; антитела к LAP; антитела к гранзиму B; антитела к LFA-1; или антитела к трансферриновому рецептору.

54. Способ по любому из вариантов осуществления 35-53, в котором синтетическая нуклеиновая кислота представляет собой синтетическую мРНК.

55. Способ по любому из вариантов осуществления 35-54, в котором носитель содержит положительно заряженный липид или полимер.

56. Способ по варианту осуществления 55, в котором положительно заряженный липид или полимер содержит сложный поли( $\beta$ -аминоэфир, поли(L-лизин), поли(этиленимин) (PEI), дендримеры поли(амидоаминов) (PAMAM), сополимеры аминов и сложных эфиров, поли(диметиламиноэтилметакрилат) (PDMAEMA), хитозан, поли-(L-лактид-ко-L-лизин), поли[ $\alpha$ -(4-аминобутил)-L-гликолевую кислоту] (PAGA) или полимер сложного эфира 4-гидрокси-L-пролина (PHP).

57. Способ по любому из вариантов осуществления 35-56, в котором покрытие содержит нейтрально или отрицательно заряженный липид или полимер.

58. Способ по варианту осуществления 57, в котором нейтрально или отрицательно заряженное покрытие содержит полиглутаминовую кислоту (PGA), поли(акриловую кислоту), альгиновую кислоту или холестерилгемисукцинат/1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин.

59. Способ по варианту осуществления 57 или 58, в котором нейтрально или отрицательно заряженное покрытие содержит цвиттер-ионный полимер.

60. Способ по любому из вариантов осуществления 57-59, в котором нейтрально или отрицательно заряженное покрытие содержит липосому.

61. Способ по варианту осуществления 60, в котором липосома содержит 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан (DOTAP), 1,2-ди-O-октадецил-3-триметиламмоний-пропан (DOTMA), 3 $\beta$ -[N-(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерин (DC-Chol), диоктадецил-амидоглицилспермин (DOGS), холестерин, 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (DOPE) или 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC).

62. Способ по любому из вариантов осуществления 35-61, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает CD4 и/или CD8.

63. Способ по любому из вариантов осуществления 35-62, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из антитела к CD4 и/или антитела к CD8.

64. Способ по любому из вариантов осуществления 35-63, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из scFv фрагмента антитела к CD4 и/или антитела к CD8.

65. Способ по любому из вариантов осуществления 35-64, в котором носитель содержит сложный поли( $\beta$ -аминоэфир).

66. Способ по любому из вариантов осуществления 35-65, в котором покрытие содержит полиглутаминовую кислоту (PGA).

67. Способ по любому из вариантов осуществления 35-66, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из антитела к CD4 и/или антитела к CD8; носитель содержит сложный поли( $\beta$ -аминоэфир); и покрытие содержит полиглутаминовую кислоту (PGA).

68. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества клеток, модифицированных посредством временной экспрессии нуклеиновой кислоты, избирательно доставляемой в клетки посредством наноносителя, который содержит:

(i) нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в положительно заряженный носитель, где синтетическая нуклеиновая кислота кодирует средство редактирования генов или изменяющий фенотип белок;

(ii) нейтрально или отрицательно заряженное покрытие на внешней поверхности носителя; и

(iii) направляющий на выбранную клетку лиганд, выступающий с поверхности покрытия;

в котором после объединения наноносителя избирательно встраивают в лимфоциты так, что лимфоциты временно экспрессируют нуклеиновую кислоту, тем самым осуществляя лечение субъекта, нуждающегося в этом.

69. Способ получения выбранной популяции клеток для введения субъекту, который включает:

получение образца от субъекта, где образец содержит гетерогенную смесь клеток, содержащую выбранную популяцию клеток;

экспонирование образца для синтетического наноносителя, который содержит:

(i) синтетическую нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в положительно заряженный носи-

тель, где синтетическая нуклеиновая кислота кодирует средство редактирования генов или изменяющий фенотип белок;

(ii) нейтрально или отрицательно заряженное покрытие на внешней поверхности носителя; и

(iii) направляющий на выбранную клетку лиганд, выступающий с поверхности покрытия;

где экспонирование ведет к избирательной доставке наноносителя в выбранную популяцию клеток, что ведет к модификации клеток в выбранной популяции клеток; и

размножение клеток в образце;

тем самым получая выбранную популяцию клеток для введения субъекту.

70. Синтетический наноноситель, содержащий:

(i) синтетическую нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в положительно заряженный носитель, где нуклеиновая кислота кодирует средство редактирования генов или изменяющий фенотип белок;

(ii) нейтрально или отрицательно заряженное покрытие на внешней поверхности носителя; и

(iii) направляющий на выбранную клетку лиганд, выступающий с поверхности покрытия;

71. Синтетический наноноситель по варианту осуществления 70, в котором синтетическая нуклеиновая кислота кодирует средство редактирования генов, выбранное из подобных активатору транскрипции эффекторных нуклеаз (TALEN); megaTAL; и/или нуклеаз с цинковыми пальцами.

72. Синтетический наноноситель по варианту осуществления 70 или 71, в котором синтетическая нуклеиновая кислота кодирует megaTAL с SEQ ID NO: 1.

73. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-72, в котором средства редактирования генов разрушают эндогенные гены, кодирующие фосфатазу Shp-1, рецептор PD1, Т-клеточные рецепторы (TCR), CCR5 и/или CXCR4.

74. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-73, в котором средства редактирования генов разрушают эндогенные гены, кодирующие  $\alpha$ -цепи TCR.

75. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-74, в котором синтетическая нуклеиновая кислота кодирует изменяющий фенотип белок, выбранный из фактора транскрипции, киназы и/или рецептора клеточной поверхности.

76. Синтетический наноноситель по варианту осуществления 75, в котором изменяющий фенотип белок выбирают из FOXO1, LKB1, TCF7, EOMES, ID2, TERT, CCR2b и/или CCR4.

77. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-76, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает лимфоциты в гетерогенной популяции клеток.

78. Синтетический наноноситель по варианту осуществления 77, где гетерогенная популяция клеток представляет собой клеточную культуру *ex vivo*.

79. Синтетический наноноситель по варианту осуществления 77, где гетерогенная популяция клеток находится *in vivo*.

80. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-79, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает Т-клетки, НК клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, В-клетки, гематопозитические стволовые клетки или их сочетание.

81. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-80, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из лиганда для рецептора лимфоцита, антитела для рецептора лимфоцита, пептидного аптамера для рецептора лимфоцита, аптамера из нуклеиновой кислоты для рецептора лимфоцита, шпигельмера для рецептора лимфоцита или их сочетания.

82. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-81, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает мотивы Т-клеточного рецептора;  $\alpha$ -цепи Т-клеток;  $\beta$ -цепи Т-клеток;  $\gamma$ -цепи Т-клеток;  $\delta$ -цепи Т-клеток;

CCR7; CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b;

CD11c; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35;

CD39; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46, CD52; CD56; CD62L; CD68; CD69;

CD80; CD86; CD95; CD101; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB);

CD148; CD163; CD209; DEC-205; F4/80; IL-4R $\alpha$ ; Sca-1; CTLA-4;

GITR; GARP; LAP;

гранзим В; LFA-1; или трансферриновый рецептор.

83. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-82, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает

CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CCR7; CD3;  
 CD4; CD5; CD8; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD35;  
 CD40; CD45RA; CD45RO; CD46; CD52; CD62L; CD69; CD80; CD95;  
 CD127; CD137, CD209 или DEC-205.

84. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-83, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из антитела к  $\alpha$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\beta$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\gamma$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\delta$ -цепям Т-клеток; антитела к CCR7; антитела к CD1a; антитела к CD1b; антитела к CD1c; антитела к CD1d; антитела к CD3; антитела к CD4; антитела к CD5; антитела к CD7; антитела к CD8; антитела к CD11b; антитела к CD11c; антитела к CD16; антитела к CD19; антитела к CD20; антитела к CD21; антитела к CD22; антитела к CD25; антитела к CD28; антитела к CD34; антитела к CD35; антитела к CD39; антитела к CD40; антитела к CD45RA; антитела к CD45RO; антитела к CD46; антитела к CD52; антитела к CD56; антитела к CD62L; антитела к CD68; антитела к CD69; антитела к CD80; антитела к CD86; антитела к CD95; антитела к CD101; антитела к CD117; антитела к CD127; антитела к CD133; антитела к CD137 (4-1BB); антитела к CD148; антитела к CD163; антитела к CD209; антитела к DEC-205; антитела к F4/80; антитела к IL-4R $\alpha$ ; антитела к Sca-1; антитела к CTLA-4; антитела к GITR; антитела к GARP; антитела к LAP; антитела к гранзиму В; антитела к LFA-1; или антитела к трансферриновому рецептору.

85. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-84, в котором связывающий домен состоит из или состоит по существу из scFv фрагмента антитела к  $\alpha$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\rho$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\gamma$ -цепям Т-клеток; антитела к  $\delta$ -цепям Т-клеток; антитела к CCR7; антитела к CD1a; антитела к CD1b; антитела к CD1c; антитела к CD1d; антитела к CD3; антитела к CD4; антитела к CD5; антитела к CD7; антитела к CD8; антитела к CD11b; антитела к CD11c; антитела к CD16; антитела к CD19; антитела к CD20; антитела к CD21; антитела к CD22; антитела к CD25; антитела к CD28; антитела к CD34; антитела к CD35; антитела к CD39; антитела к CD40; антитела к CD45RA; антитела к CD45RO; антитела к CD46; антитела к CD52; антитела к CD56; антитела к CD62L; антитела к CD68; антитела к CD69; антитела к CD80; антитела к CD86; антитела к CD95; антитела к CD101; антитела к CD117; антитела к CD127; антитела к CD133; антитела к CD137 (4-1BB); антитела к CD148; антитела к CD163; антитела к CD209; антитела к DEC-205; антитела к F4/80; антитела к IL-4R $\alpha$ ; антитела к Sca-1; антитела к CTLA-4; антитела к GITR; антитела к GARP; антитела к LAP; антитела к гранзиму В; антитела к LFA-1; или антитела к трансферриновому рецептору.

86. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-85, в котором синтетическая нуклеиновая кислота представляет собой синтетическую мРНК.

87. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-86, в котором носитель содержит положительно заряженный липид или полимер.

88. Синтетический наноноситель по варианту осуществления 87, в котором положительно заряженный липид или полимер содержит сложный поли( $\beta$ -аминоэфир, поли(L-лизин), поли(этиленимин) (PEI), дендримеры поли-(амидоаминов) (PAMAM), сополимеры аминов и сложных эфиров, поли(диметиламиноэтилметакрилат) (PDMAEMA), хитозан, поли-(L-лактид-ко-L-лизин), поли[ $\alpha$ -(4-аминобутил)-L-гликолевую кислоту] (PAGA) или полимер сложного эфира 4-гидрокси-L-пролина (PHP).

89. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-88, в котором покрытие содержит нейтрально или отрицательно заряженный липид или полимер.

90. Синтетический наноноситель по варианту осуществления 89, в котором нейтрально или отрицательно заряженное покрытие содержит полиглутаминовую кислоту (PGA), поли(акриловую кислоту), альгиновую кислоту или холестерилгемисукцинат/1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин.

91. Синтетический наноноситель по варианту осуществления 89 или 90, в котором нейтрально или отрицательно заряженное покрытие содержит цвиттер-ионный полимер.

92. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 89-91, в котором нейтрально или отрицательно заряженное покрытие содержит липосому.

93. Синтетический наноноситель по варианту осуществления 92, в котором липосома содержит 1,2-диолеил-3-триметиламмоний-пропан (DOTAP), 1,2-ди-О-октадеценил-3-триметиламмоний-пропан (DOTMA), 3 $\beta$ -[N-(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерин (DC-Chol), диоктадецил-амидоглицилспермин (DOGS), холестерин, 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE) или 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC).

94. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-93, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд избирательно связывает CD4 и/или CD8.

95. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-94, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из антитела к CD4 и/или антитела к CD8.

96. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-95, в котором направ-

ляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из scFv фрагмента антитела к CD4 и/или антитела к CD8.

97. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-96, в котором носитель содержит сложный поли( $\beta$ -аминоэфир).

98. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-97, в котором покрытие содержит полиглутаминовую кислоту (PGA).

99. Синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-98, в котором направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из антитела к CD4 и/или антитела к CD8; носитель содержит сложный поли( $\beta$ -аминоэфир); и покрытие содержит полиглутаминовую кислоту (PGA).

100. Композиция, которая содержит синтетический наноноситель по любому из вариантов осуществления 70-99.

101. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение терапевтически эффективного количества наноносителя по любому из вариантов осуществления 70-99 или композиции по варианту осуществления 100, тем самым осуществляя лечение субъекта, нуждающегося в этом.

102. Использование наноносителя, раскрытого в настоящем описании, для избирательной доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR или TCR, в выбранный тип клеток.

### Пример

#### Введение.

Направление иммунного ответа на злокачественную опухоль посредством генетического конструирования Т-клеток, чтобы экспрессировать химерные антигенные рецепторы (CAR) или Т-клеточные рецепторы (TCR), представляет собой терапию, которая начинает приносить значимые результаты, и важные клинические исследования не за горами. Процесс биоинженерии "живых лекарственных средств" из Т-клеток, которые могут увеличиваться в числе, последовательно разрушать опухолевые клетки и в конечном итоге дифференцироваться в долгоживущие Т-клетки памяти требует стабильного встраивания трансгенов рецепторов в геном лимфоцита. Несмотря на время и затраты, необходимые для их получения, а также ограничения по размеру и числу генов, которые они могут упаковывать, вирусные векторы в настоящее время являются наиболее эффективным средством программирования этих клеток с использованием возможностей распознавания опухолей для применений (Zhang et al., *Nat Commun* 6, 7639 (2015); Cribbs et al., *BMC Biotechnol* 13, 98 (2013)).

Помимо этих систем хронической экспрессии генов, также возможно индуцировать фенотипические изменения в клетках через временную экспрессию макромолекул, которые направляют механизмы "наскок-и-отход". В большинстве из этих временных применений постоянная экспрессия терапевтического трансгена является нежелательной и потенциально опасной (Wurm et al., *Exp Hematol* 42, 114-125 e114 (2014)); примеры включают использование факторов транскрипции для того, чтобы управлять дифференцировкой клеток (Themeli et al., *Nat Biotechnol* 31, 928-933 (2013); Costa et al., *Development* 142, 1948-1959 (2015)) и экспрессией нуклеаз со специфичностью к определенным последовательностям, чтобы конструировать геномы (Cox et al., *Nat Med* 21, 121-131 (2015)).

Несмотря на то, что растет число применений, где временная генная терапия может по существу усовершенствовать лечебный потенциал сконструированных Т-клеток, доступные в настоящее время способы (которые, подобно способам хронической экспрессии, описанным выше, главным образом на основе вирусных векторов) осложнены расходами на сложные протоколы, необходимые для того, чтобы осуществлять трансдукцию (Nightingale et al., *Mol Ther* 13, 1121-1132 (2006)). Электропорацию разрабатывали в качестве альтернативного способа трансфекции, но механическая пермеабилзация плазматических мембран подвергает риску жизнеспособность Т-клеток, что обозначает, что эти подходы не подходят для масштабных применений. Кроме того, подобно способам на основе вирусов, электропорация не позволяет избирательно трансфицировать конкретные типы клеток из гетерогенного пула, так что ей должен предшествовать процесс очистки клеток.

В этом примере описан нанореактив, который вызывает временную экспрессию гена в культивируемых Т-клетках, и выполняет это без связанных протоколов или сложного вспомогательного оборудования. Надлежащим образом разработанный наноноситель мРНК позволяет выполнять контролируемую дозой доставку функциональных макромолекул в лимфоциты просто посредством смешивания реактива с клетками *in vitro* (фиг. 1A).

Эти наночастицы (NP) могут связываться с целевыми подтипами клеток и стимулировать рецепторно-опосредованный эндоцитоз, который обеспечивает проникновение синтетической мРНК, которую они несут и позволяет лимфоцитам экспрессировать кодируемую молекулу. Поскольку ядерный транспорт и транскрипция трансгена не требуются, этот процесс является быстрым и эффективным. По меньшей мере в двух примерах проиллюстрировано, как эту новую платформу можно реализовать для производства превосходных CAR-Т-клеточных продуктов для клинического использования. В первом применении направленные наноносители мРНК использовали в качестве инструмента редактирования генома для Т-клеток. Доставка мРНК, кодирующей редко расщепляющую нуклеазу megaTAL (Boissel et al.,

Methods Mol Biol 1239, 171-196 (2015)) позволяет эффективно нарушать экспрессию Т-клеточного рецептора лимфоцитами. Во втором применении временно экспрессировали Foxo1, ключевой регулятор, который перепрограммирует дифференцировку эффекторных клеток в функционально компетентные клетки памяти (Tejera, et al., J Immunol 191, 187-199 (2013); Kim et al., Immunity 39, 286-297 (2013)). Результаты демонстрируют, что экспозиция для сконструированных наночастиц толкает Т-клетки в направлении фенотипа центральной памяти.

Наиболее значимый эффект системы состоит в ее простоте для достижения генетических модификаций терапевтических клеток в клиническом масштабе: все, что необходимо, это смешать подходящий реактив наночастиц с лимфоцитами. Подход очевидно контрастирует с теми, которые в настоящее время используют для временной доставки генетического материала, которые менее эффективны и включают много специализированных, дорогостоящих и проприетарных процедур, которые ограничивают их доступность. Помимо Т-клеточной терапии, платформу временной доставки гена можно легко встраивать в существующие производственные процессы для других типов терапевтических клеток (например, естественных киллерных клеток, дендритных клеток, гематопоэтических стволовых клеток или мезенхимальных стволовых клеток), чтобы по существу усовершенствовать их лечебный потенциал, не увеличивая время манипуляций, риск или сложность.

Материалы и способы. План исследования. Цель этого проекта состояла в том, чтобы разработать наноматериал для направленной доставки мРНК в первичные Т-клетки *in vitro*. Пилотные эксперименты осуществляли для того, чтобы оптимизировать опосредованную наночастицей доставку для конкретных применений, используя клетки, получаемые от индивидуальных доноров, после чего следовало воспроизвести оптимизированные протоколы с использованием образцов от нескольких доноров.

Синтез РВАЕ 447. Этот полимер синтезировали с использованием способа, схожего с тем, который описан в Mangraviti et al. (Mangraviti et al., ACS Nano 9, 1236-1249 (2015)). 1,4-бутандиолдиакрилат объединяли с 4-амино-1-бутанолом в молярном соотношении диакрилата и мономера амина 1,1:1. Смесь нагревали до 90°C при перемешивании в течение 24 ч для получения поли(4-амино-1-бутанол-ко-1,4-бутандиолдиакрилата), заканчивающегося акрилатом. 2,3 г этого полимера растворяли в 2 мл тетрагидрофурана (THF). Для того чтобы формировать кэпированный пиперазином 447 полимер, 786 мг 1-(3-аминопропил)-4-метилпиперазина, растворенного в 13 мл THF, добавляли в раствор полимера/THF. Получаемую смесь перемешивали при RT в течение 2 ч, затем кэпированный полимер преципитировали с использованием 5 объемов простого диэтилового эфира. После декантирования растворителя, полимер промывали в 2 объемах свежего простого эфира, затем остаток сушили под вакуумом в течение 2 суток перед использованием для того, чтобы формировать сток из 100 мг/мл в DMSO, которых хранили при -20°C.

Конъюгация PGA-антитела. 15 кДа полиглутаминовую кислоту (из Alamanda Polymers) растворяли в воде для того, чтобы формировать 20 мг/мл, и обрабатывали звуком в течение 10 мин. Добавляли равный объем 4 мг/мл 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (Thermo Fisher) в воде, и раствор смешивали в течение 5 мин при RT. Затем получаемую активированную PGA объединяли с антителами в молярном соотношении 4:1 в фосфатно-солевом буфере (PBS) и смешивали в течение 6 ч при RT. Для того чтобы удалять несвязанную PGA, раствор обменивали 3 раза с PBS через мембрану 50,000 NMWCO (Millipore). Концентрации антител определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Для экспериментов с Т-клетками использовали антитела против CD3 (клон ОКТ3), против CD4 (клон ОКТ4), против CD8 (клон ОКТ8) и против CD28 (клон 9.3, все из BioX-Cell). Клон C1.18.4 использовали в качестве контрольного антитела. Для трансдукции HSC использовали поликлональное антитело козы против IgG мыши и поликлональное антитело козы против CD105 мыши (Fisher).

Синтез мРНК. Кодон-оптимизированную мРНК для eGFP, Foxo1, Treg2 и TRAC-megaTAL, полностью замененную с использованием модифицированных рибонуклеотидов псевдоуридин (Ψ) и 5-метилцитидин (m5C) и кэпированную с использованием ARCA, получали с помощью TriLink Biotechnologies. Авторы изобретения конъюгировали Ψ- и m5C-модифицированную мРНК eGFP с cy5 (также из TriLink) для отслеживания доставки этих транскриптов.

Получение наночастиц. Стоки мРНК разводили до 100 мкг/мл в стерильном безнуклеазном 25 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,2 (NaOAc). Полимер РВАЕ-447 в DMSO разводили до 6 мг/мл в NaOAc и добавляли к мРНК в соотношении 60:1 (масс.:масс.). После того, как получаемую смесь энергично перемешивали в течение 15 с на средней скорости, ее инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, так что могли формироваться NP. Чтобы добавлять направляющие элементы к наночастицам, PGA-связанные антитела разводили до 250 мкг/мл в NaOAc и добавляли в соотношении 2,5:1 (масс.:масс.) в мРНК. Получаемую смесь энергично перемешивали в течение 15 с на средней скорости и затем инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, чтобы сделать возможным связывание PGA-Ab с NP.

Наночастицы лиофилизировали посредством их смешивания с 60 мг/мл D-сахарозой в качестве криопротектора и их мгновенной заморозки в жидком азоте, перед их обработкой в FreeZone 2.5 L Freeze Dry System (Labconco). Лиофилизированные NP хранили при -80°C до использования. Для применения лиофилизированные NP ресуспендировали в объеме стерильной воды для восстановления их исходной

концентрации.

Определение характеристик наночастиц.

Гидродинамический радиус созданных частиц измеряли с использованием Nanosite (Malvern), а их дзета-потенциал определяли с использованием динамического рассеяния света, обнаруживаемого с использованием прибора ZetaPALS (Brookhaven Instrument Corporation). Частицы разводили 1:400 (об./об.) в PBS (pH 7,4) для измерения размера и 1:40 для количественного определения дзета-потенциал. Для трансмиссионной электронной микроскопии, каждый образец наночастиц 25 мкл наносили на активированные тлеющим разрядом медные решетки 200 меш, покрытые углеродом/формваром. После 30 с решетками последовательно касались капли  $1/2$  фиксатора Карновского, капли 0,1 М какодилатного буфера, 8 капель  $dH_2O$  и затем капли 1% мас./об. фильтрованного уранилацетата. Эти образцы исследовали с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEOL JEM-14 00 (JEOL USA).

Клеточные линии и среды для культивирования. Клетки K562-CD19 и контрольные клетки K562 предоставлены доктором Stanley Riddell (Fred Hutchinson Cancer Research Center). TM-LCL представляет собой CD19<sup>+</sup> EBV-трансформированную лимфобластическую клеточную линию, которую оптимизировали для использования в качестве кормушки для размножения Т-клеток (36). Т-клеточную линию Jurkat-E6 получали из American Type Culture Collection. Эти линии культивировали в среде для Т-клеток (TCM): RPMI-1640, содержащая 10% эмбриональную телячью сыворотку, 0,8 мМ L-глутамин, 25 мМ буфер HEPES и 1% пенициллин-стрептомицин.

Первичные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) человека и Т-клетки культивировали в TCM с добавлением 50 ME IL-2/мл (Preprotech) или в ImmunoCult-XF T Cell Expansion Medium (XFSFM) (Stemcell), как указано.

мРНК трансфекция Т-клеток. Криосохраненные PBMC от нормальных доноров оттаивали посредством добавления теплой TCM по каплям, после чего следовало центрифугирование. Где указано, CD8 Т-клетки выделяли посредством отрицательного отбора (Stemcell). Клетки культивировали в TCM+IL-2 по  $10^6$  клеток/мл и стимулировали CD3/CD28 бусами (Dynabeads, Life Technologies) в соотношении бусы:клетки 1:1. Для экспериментов с использованием трансдукции  $\alpha$ CD3-направленными наночастицами, эти бусы удаляли за 24 ч до добавления NP.

Для NP-опосредованной трансфекции Т-клетки ресуспендировали в XFSFM до концентрации  $2 \times 10^6$ /мл. Направленные антителами NP, содержащие 2,5 мкг мРНК/ $10^6$  клеток, добавляли в эту суспензию для экспозиции в течение 2 ч при 37°C, затем клетки промывали 3 объемами TCM+IL-2. Контрольные NP содержали мРНК eGFP. NP для редактирования генов TCR $\alpha$  содержали мРНК TRAC-megaTAL, Trex2 и eGFP в соотношении мас.:мас.:мас. 42:42:16. Foxo13A NP содержали мРНК Foxo13A и eGFP в соотношении мас.:мас. 84:16.

Для электропорации  $2 \times 10^6$  Т-клеток промывали два раза в PBS, содержащем 0,5% бычий сывороточный альбумин (BSA), ресуспендировали в 100 мкл среды для электропорации Т-клеток (Lonza), содержащей 3 мкг мРНК eGFP, переносили в кювету для электропорации и обрабатывали в приборе Nucleofector (Lonza) с использованием программы T-20. Клетки с порами переносили в чашку, содержащую 2 мл TCM+IL-2 без антибиотиков.

NP трансдукция CD34<sup>+</sup> клеток. CD34<sup>+</sup> клетки, очищенные от PBSC, предварительно мобилизованных от нормальных доноров, получали из Hematopoietic Cell Processing and Repository Core в Fred Hutchinson Cancer Research Center. После оттаивания клетки считали, затем культивировали в течение ночи в концентрации  $10^6$ /мл в среде HSC: бессывороточной среде StemSpan SFEMII с добавлением 50 нг/мл фактора стволовых клеток (Scf) человека, 50 нг/мл лиганда Flt3/Flk-2 мыши и 25 нг/мл тромбопоэтина человека (Stemcell Technologies)]. На следующие сутки клетки собирали, считали и ресуспендировали в 100 мкл HSC без цитокинов по  $2,5 \times 10^4$  клеток/лунка в 96-луночном тканевом культуральном планшете (Costar). Клетки оставляли без обработки или обрабатывали с использованием NP, CD105-направленных или контрольных направленных против мыши, содержащих 1 мкг мРНК eGFP на лунку. Клетки обрабатывали с использованием NP в течение 1 ч, затем промывали два раза в 1 мл среды HSC без цитокинов. Затем промытые клетки переносили в 500 мкл полной среды HSC в 24-луночные тканевые культуральные планшеты; через 48 ч клетки метили по CD34 и CD105 (BioLegend) для анализа с помощью проточной цитометрии.

ПЦР амплификация и обнаружение инсерций-делеций TCR $\alpha$ . Обнаружение инсерций-делеций осуществляли с использованием Genart Genomic Cleavage Detection Kit (Invitrogen) по инструкциям производителя. В кратком изложении, лизировали Т-клетки и амплифицировали геномную ДНК, фланкирующую целевой участок TCR $\alpha$  MegaTAL, посредством ПЦР с использованием этих праймеров:

TRAC-прямой

CCCGTGTCAATTCTCTGGACT (SEQ ID NO: 53),

и TRAC-обратный

ATCACGAGCAGCTGGTTTCT (SEQ ID NO: 54).

ПЦР продукт денатурировали, повторно отжигали и обрабатывали ферментом для обнаружения, так что формирование инсерций-делеций можно было оценивать посредством сравнения плотности по-

лос на геле для зародышевой линии и специфично расщепленных полос.

Лентивирусная трансдукция и размножение Т-клеток с использованием 19-41BB $\zeta$  CAR. Конструкцию CAR против CD19 человека, содержащую сигнальные домены 41BB и CD3 $\zeta$  (19-41BB $\zeta$ , модифицировали с использованием одной StrepTag, как описано (Liu et al., Nat Biotechnol 34, 430-434 (2016)), и переносили в лентивирусный вектор ерHIV7. VSVG псевдотипированный лентивирус получали через трансфекцию с фосфатом кальция (Invitrogen) клеток 293T Lenti-X (Clontech) лентивирусным вектором ерHIV7 и вирусными упаковывающими плазмидами рCMVdR8.91 и рMD2.G. Для лентивирусной трансдукции Т-клетки переносили в покрытые ретронектином планшеты (Takara) с 8 мкг/мл полибреина и кодирующим 19-41BB $\zeta$ -CAR лентивирусом при MOI 5:1, затем осуществляли спинфекцию в течение 1 ч при 800хд и 34°C. Для избирательного размножения 19-41BB $\zeta$ -трансдуцированных клеток лимфоциты стимулировали облученными (7000 рад) CD19<sup>+</sup> TM-LCL клетками в соотношении 1:7 в TCM+IL-2.

Сортировка клеток и проточная цитометрия. Данные получали с использованием клеточных анализаторов BD LSRFortessa или FacsCanto II, работающих на программном обеспечении FACSDIVA, сортировали на BD FACS ARIA-II и анализировали с использованием FlowJo v10.1. Антитела, используемые в проточной цитометрии, перечислены на фиг. 2.

Внутриклеточное окрашивание цитокинов. Клетки культивировали в течение 6 ч в TCM с 3 мкг/мл брефелдина A  $\pm$ 20 нг/мл PMA и 1 мкг/мл иономицина (Sigma-Aldrich). Перед фиксацией окрашивание против CD8 и против CD3 использовали для того, чтобы идентифицировать субпопуляции TCR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> и TCR<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> клеток. Затем клетки подвергали воздействию набора Fix and Perm (BD Biosciences) перед мечением с использованием mAb против IFN- $\gamma$  и IL-2 (BioLegend).

Внутриклеточное окрашивание Foxo1. 10<sup>6</sup> Т-клеток Jurkat трансфицировали с использованием NP, направленных против CD3, содержащих 3 мкг мРНК eGFP или 2,5 мкг Foxo13A и 0,5 мкг мРНК eGFP. Через 24 ч клетки фиксировали с использованием 4% параформальдегида в PBS, промывали один раз и пермеабилizовали с использованием 90% ледяного метанола в течение 30 мин. Эти образцы блокировали с использованием 0,5% BSA в PBS при комнатной температуре, затем окрашивали антителом кролика против Foxo1 (клон C29H4) или изотипа (клон DAE1), после чего следовало F(ab')<sub>2</sub> Alexa-647 против IgG кролика (Cell Signalling).

Анализ цитолиза CAR-Т-клеток. Специфический цитолиз клеток-мишеней CAR анализировали с помощью проточной цитометрии. Клетки-мишени K562- CD19 метили слабым (0,4 мкМ) и контрольные K562 сильным (4,0 мкМ) сложным карбоксифлуоресцеинсукцинимидиловым эфиром (CFSE) в течение 15 мин при 37°C. Оба образца промывали в полной среде, содержащей сыворотку, смешивали в соотношении 1:1, затем совместно культивировали с 19-41BB $\zeta$  при указанных соотношениях эффектор:мишень. Для того чтобы оценивать специфический цитолиз, каждое условие окрашивали с использованием mAb против CD8 (BioLegend) для того, чтобы идентифицировать Т-клетки, и с использованием 7AAD для того, чтобы исключать погибшие клетки, и анализировали с помощью проточной цитометрии. Специфический цитолиз клеток оценивали посредством измерения соотношения жизнеспособных CD19<sup>+</sup> клеток-мишеней (слабый CFSE) и контрольных CD19<sup>-</sup> K562 клеток (сильный CFSE).

Микроскопия. 10<sup>6</sup> Т-клеток в 400 мкл XFSFM обрабатывали с использованием NP, направленных против CD3, содержащих 3 мкг су5-меченной мРНК eGFP, в течение 1 ч при 4°C для связывания с поверхностью, после чего следовало 2 ч инкубации при 37°C для интернализации. После этих обработок клетки промывали 3 раза в холодном PBS и загружали предметные стекла, на покрытые поли-L-лизин (Sigma), в течение 30 мин при 4°C. Образцы фиксировали в 2% параформальдегиде, заливали реактивом ProLong Gold Antifade (Invitrogen) и визуализировали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 780 NLO.

Очистка РНК, RT-ПЦР, секвенирование и биоинформационный анализ. После лизиса Т-клеток в реактиве Trizol (Ambion), общую РНК выделяли с использованием набора DirectZol (Zymo) с расщеплением ДНК на колонке по инструкциям производителя. Для количественной ПЦР в реальном времени (qPCR) получали кДНК с использованием High Capacity cDNA Kit (Applied Biosystems). Уровни экспрессии эндогенного FOXO1 и FOXO13A с оптимизированными кодонами относительно гена домашнего хозяйства B2M измеряли с использованием анализа PrimeTime qPCR (Integrated DNA Technologies) и прибора QuantStudio5 (Applied Biosystems). Праймеры, используемые для того, чтобы обнаруживать Foxo13A с оптимизированными кодонами, выбирали для того, чтобы избегать перекрестного обнаружения мРНК эндогенного Foxo1:

Foxo13A прямой: GGACAGCCTAGAAAGAGCAG (SEQ ID NO: 55);

Foxo13A зонд: AGGTCGGCGTAGCTCAGATTGC (SEQ ID NO: 56);

Foxo13A обратный: CTCTTGACCATCCACTCGTAG (SEQ ID NO: 57).

Для анализа последовательности РНК выделяли образцы РНК из культивируемых in vitro контрольных NP- и обработанных Foxo13A NP CD8<sup>+</sup> клеток после 3 и 8 суток и сравнивали с сортированными эталонными наивными (CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup>) и TCM (CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>) клетками из двух независимых криосохраненных образцов РВМС при совместимости доноров. Библиотеки последовательностей РНК получали с использованием набора для подготовки образцов TruSeq (Illumina) по

инструкциям производителя. Библиотеки секвенировали в течение 50 циклов (спаренные концы) на платформе HiSeq (Illumina). Выравнивали результаты, которые проходили обращение к базе Illumina и фильтры качества для генома человека hg38 с использованием TopHat v2.1.0. Подсчеты генерировали для каждого гена с использованием htseq-count (v0.6.1p1), реализованного в режиме перекрытий "intersection-strict". Способ GLM в edgeR использовали для нормализации данных и дифференциального анализа экспрессии. Сигнатурные наборы генов ТСМ определяли как лучшие 500 генов, ранжированных по статистической значимости с более высокой (ТСМ, верхние) или более низкой (ТСМ, нижние) экспрессией в CD8<sup>+</sup> ТСМ в сравнении с контрольными обработанными NP CD8<sup>+</sup> Т-клетками в сутки 8 при совместимости доноров. Обогащение наборов генов анализировали с использованием программного обеспечения GSEAPreranked, используя списки генов, ранжированных по признаку кратности изменения  $\times 1/(p\text{-значение})$  (37). Необработанные и обработанные данные из анализа последовательностей РНК размещали в серии NCBI Gene Expression Omnibus, GEO, номер доступа GSE89134 (38).

Статистический анализ.

Если не указано иное, графики показывают среднее+стандартную ошибку среднего. Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения Prism (Graphpad).

Результаты.

Разработка наночастиц мРНК для координации надежной экспрессии трансгена в Т-клетках. Для того чтобы создавать реактив, который может генетически модифицировать первичные Т-лимфоциты (которые являются исходно рефракторными к невирусным способам трансфекции), биоконструировали полимерные наночастицы, содержащие четыре функциональных компонента (фиг. 1В):

(i) поверхностно-закрепленные направляющие лиганды, которые избирательно связывают наночастицы с Т-клетками и инициируют быстрый индуцированный рецептором эндоцитоз, чтобы интернализировать их. В экспериментах использовали антитела против CD3 и против CD8;

(ii) отрицательно заряженное покрытие, которое защищает наночастицы для того, чтобы минимизировать связывание вне мишени посредством снижения поверхностного заряда наночастиц. Поскольку это уже широко используют в платформах доставки лекарственных средств, полиглутаминовую кислоту (PGA) выбирали для выполнения этого;

(iii) матрица носителя, которая конденсирует и защищает нуклеиновые кислоты от ферментативного разрушения, пока они находятся в эндосоме, но высвобождает их, когда частицы транспортированы в цитоплазму, тем самым делая возможной транскрипцию кодируемого белка. Для этого использовали биоразрушаемый состав полимера сложного поли ( $\beta$ -аминоэфир) (РВАЕ), который имеет время полужизни между 1 и 7 часами в водных условиях; и

(iv) нуклеиновые кислоты, которые инкапсулируют в носителе и которые ведут к редактированию генов или временной экспрессии белков, которые могут перманентно изменять фенотип Т-клетки. мРНК представляет собой идеальную платформу для временной экспрессии терапевтического белка, поскольку она не имеет потенциала встраивания в геном и не требует ядерной локализации для экспрессии. Однако не модифицированная мРНК может активировать внутриклеточные Toll-подобные рецепторы, ограничивая экспрессию белка и приводя к токсичности (Kariko et al., *Immunity* 23, 165-175 (2005)).

Чтобы усовершенствовать стабильность и снизить иммуногенный потенциал доставляемой мРНК, использовали синтетические версии, которые содержат модифицированные нуклеотиды. Например, замена уридина и цитидина на сконструированные основания псевдоуридин и 5-метилцитидин синергически блокирует распознавание врожденными рецепторами опознавания паттерна и усиливает трансляцию мРНК.

NP изготавливали с использованием двухстадийного процесса самосборки, движимого зарядами. Сначала получали комплекс синтетической мРНК с положительно заряженным полимером РВАЕ, который конденсирует мРНК в наноразмерные комплексы (фиг. 3А, 3В). За этой стадией следовало добавление PGA, функционализированной антителами, которая экранирует положительный заряд частиц РВАЕ-мРНК и придает направленность на лимфоциты. Получаемые наночастицы мРНК имели размер  $109,6 \pm 26,6$  нм и почти нейтральный поверхностный заряд (дзета-потенциал  $1,1 \pm 5,3$  мВ, фиг. 3С).

Наночастицы мРНК достигают эффективности трансфекции Т-клеток, схожих с электропорацией, но не снижают жизнеспособность. Задача состоит в организации изготовления клеточной терапии, так что сначала тестировали, достаточно ли простого добавления направленных наночастиц мРНК к стабилизированной культуре лимфоцитов человека, чтобы координировать их надежную трансфекцию. Когда CD3-направленные NP, несущие мРНК, кодирующую репортер (усиленный зеленый флуоресцентный белок, eGFP), инкубируют с этими клетками, они не только связываются с ними, но также стимулируют рецепторно-опосредованный эндоцитоз, обеспечивая проникновение генов, которые несут частицы (фиг. 4А). После одного применения NP (соотношение NP:Т-клеток= $2 \times 10^4$ : 1) 85% этих первичных Т-клеток (фиг. 4В) обычным образом трансфицировали, с наблюдением экспрессии трансгена всего через 5 ч после трансфекции (фиг. 5А). Таким образом, этот процесс является быстрым и эффективным. Важно, что не необходимо получать свежие мРНК NP для каждого применения, а наоборот возможно их лиофилизировать перед их использованием без изменения свойств или эффекта (фиг. 5В).

Затем оценивали влияние направленных мРНК-несущих NP на размножение Т-клеток. Поскольку

злокачественные новообразования часто прогрессируют быстро, важно, что сконструированные Т-клетки можно быстро размножить до клинически важных масштабов. Один широко используемый подход для размножения поликлональных лимфоцитов в клинических лабораториях состоит в их инкубации с бусами, которые покрывают антителами против TCR/CD3 и костимулирующих рецепторов CD28. Даже повторные трансфекции с использованием CD3-направленных NP (соотношение NP:Т-клетки  $2 \times 10^4:1$ ) не мешает размножению Т-клеток, стимулируемых этими покрытыми бусами (фиг. 4С). Этот результат резко контрастирует с электропорацией Т-клеток, которую тестировали параллельно. Электропорация не только добавляет сложные стадии манипуляций с клетками (такие как смены сред и циклы центрифугирования, фиг. 4D), этот способ подвергает риску жизнеспособность лимфоцитов (фиг. 6), что снижало выход Т-клеток в 60 раз (фиг. 4D, правая часть).

Трансфекция наночастицами незаметно встраивается в последовательность операций изготовления CAR-Т-клеток для достижения эффективного редактирования генома. Подход тестировали в клинически значимом применении посредством встраивания NP-опосредованной трансфекции мРНК в изготовление лейкоз-специфических 19-41BB $\zeta$  CAR Т-клеток (фиг. 7A). CD19-направленные рецепторы являются наиболее изученным CAR-Т-клеточным продуктом на сегодняшний день, с почти 30 текущими международными клиническими исследованиями (Sadelain et al., *J Clin Invest* 125, 3392-3400 (2015)). Способность теперь выполнять конструирование генома дает потенциал для усовершенствования безопасности и эффекта CAR-Т-клеток. Например, экспрессию эндогенных TCR можно устранять для того, чтобы избежать реакции трансплантат против хозяина. Кроме того, гены иммунных контрольных точек можно избирательно удалять для усиления их активности в супрессорном опухолевом окружении (Menger et al., *Cancer Res* 76, 2087-2093 (2016); Torikai et al., *Blood* 119, 5697-5705 (2012)). Однако использование электропорации для доставки средств редактирования генома в клетки создает существенный барьер для масштабирования изготовления Т-клеток. Соответственно, способность NP доставлять средства редактирования генов измеряли посредством получения частиц, несущих мРНК, кодирующей нуклеазу megaTAL, которая направлена на константную область (TRAC) гена  $\alpha$  TCR. Используя преимущество гибкости, даваемое способами формулирования NP, мРНК, кодирующую репарирующую ДНК эндонуклеазу TREX2, включали для усовершенствования эффективности нокаута, наряду с мРНК eGFP для отслеживания трансфекции. Контрольные частицы загружали с использованием только мРНК eGFP. В отличие от eGFP-трансфекции (которая не влияет на экспрессию TCR; фиг. 7B, верхний ряд), добавление частиц TCR $\alpha$ -megaTAL в Т-клеточную культуру эффективно нарушало экспрессию TCR на сутки 5, этот эффект сохранялся после утраты мРНК на сутки 12 (фиг. 7B, нижний ряд). Усредненные уровни TCR составляли 60,8% по сравнению с контролями (17,7%; фиг. 73C), что соответствует процентной доле частот инсерций-делений (мера эффективности направленного воздействия), которую определяли с использованием оценочного анализа (фиг. 7D). Важно, что присутствие мРНК-несущих наночастиц не оказывало влияния на опосредованный вирусом перенос гена для опухолеспецифичного CAR, поскольку равных эффективностей трансдукции с лентивирусным вектором, кодирующим 19-41BB $\zeta$  CAR, достигали в NP-трансфицированных и не трансфицированных Т-клетках (фиг. 7E). После NP-опосредованного редактирования генома и лентивирусной трансдукции CAR-запрограммированные Т-клетки полностью сохраняли свои способности к пролиферации, секреции цитокинов и цитолизу лейкозных клеток-мишеней (фиг. 7F-7H). В общем, эти находки доказывают, что направленные на лимфоциты наноносители мРНК могут опосредовать эффективное редактирование генома CAR-Т-клеток без нарушения их функции.

NP-доставляемая мРНК, кодирующая фактор транскрипции Foxo1, осуществляет импринтинг CAR-Т-клеток памяти. Затем исследовали, могут ли лимфоцит-направленные мРНК NP усовершенствовать терапевтическую активность CAR-Т-клеток посредством доставки мРНК, которая программирует их в направлении благоприятного фенотипа. Клинические находки уже подтвердили, что Т-клеточные продукты, получаемые из CD62L<sup>+</sup> центральных Т-клеток памяти (TCM), демонстрируют усовершенствованное приживание и функцию в животных моделях, и фракция клеток фенотипа CD62L<sup>+</sup> TCM в инфузионных продуктах связана с успешной CAR терапией (Louis et al., *Blood* 118, 6050-6056 (2011); Sommermeier et al., *Leukemia* 30, 492-500 (2016)). Однако для достижения терапевтически значимого числа лимфоцитов, эти клетки должны проходить раунды стимуляции/размножения *in vitro* - процесса, который ведет клетки от линии дифференцировки TCM и в направлении терминальной дифференцировки и старения (Wang et al., *Journal of immunotherapy* 35, 689-701 (2012)). Чтобы разобраться с этой проблемой, изготавливали направленные на Т-клетки NP, нагруженные мРНК, кодирующей фактор транскрипции Foxo1 семейства Forkhead, который контролирует переход от эффекторных клеток к клеткам памяти у CD8 Т-клеток (Tejera, et al., *J Immunol* 191, 187-199 (2013); Kim et al., *Иммунитет* 39, 286-297 (2013)). Во время стимуляции/размножения *in vitro*, TCR и цитокиновая сигнализация активируют киназу АКТ. Этот фермент фосфорилирует Foxo1, что ведет к его цитоплазматической сегрегации и блокаде транскрипционной активности. Для того чтобы поддерживать Foxo1 в культивируемых Т-клетках, использовали АКТ-нечувствительный вариант фактора, в котором три ключевые фосфорилированные остатка мутированы в аланин (Foxo13A). Предложена гипотеза о том, что добавление Foxo13A-содержащих NP в среду Т-клеточной культуры во время размножения *ex vivo* будет способствовать развитию CD62L<sup>+</sup> TCM кле-

ток, которые обладают усовершенствованным терапевтическим потенциалом. Эффект, который факторы транскрипции оказывают на перепрограммирование, чувствителен к величине и длительности их экспрессии. Для того чтобы определять эти значения после добавления Foxo13A-NP, измеряли белок Foxo1 и экспрессию мРНК в клетках, обработанных наночастицами. В Т-клеточной линии Jurkat эндогенная экспрессия Foxo1 низка и обработка с использованием Foxo13A NP вела к значительному увеличению общей экспрессии фактора, который измеряли посредством внутриклеточного мечения (фиг. 8А, левая часть). В первичных Т-клетках уровни экспрессии белка Foxo1 уже высоки, и Foxo13A-NP ведут только к умеренному увеличению. Это указывает на то, что обработка NP может индуцировать почти физиологические уровни активного фактора транскрипции Foxo13A (фиг. 8А, правая часть). Для того чтобы определять динамику мРНК после NP трансфекции активированных пролиферирующих Т-клеток, экспрессию Foxo13A измеряли с использованием количественной ПЦР в реальном времени со специфичностью к сконструированной мРНК. мРНК экспрессия была максимальной в сутки 1 и близкой к базовому уровню на 8 сутки после трансфекции (фиг. 8В). Обработка с использованием Foxo13A NP после примирования Т-клеток *in vitro*, быстро повышала экспрессию CD62L (фиг. 8С), который является первичным маркером поверхности, который отличает TCM от популяций эффекторов и эффекторов памяти (Sallusto et al., *Nature* 401, 708-712 (1999)). Для того чтобы определять, может ли временная экспрессия Foxo13A вести к персистирующим изменениям в дифференцировке CD8<sup>+</sup> Т-клеток, клетки от 3 независимых доноров обрабатывали CD8-направленными Foxo13A-eGFP NP, сортировали на основании экспрессии eGFP и поддерживали *in vitro*. Увеличенную частоту CD62L<sup>+</sup> клеток наблюдали через 24 ч после трансфекции, и это сохранялось даже на 8 и 20 сутки после добавления NP (фиг. 8D).

Для понимания генетической регуляторной сети, индуцируемой с помощью Foxo13A, и ее связи с линией дифференцировки TCM, осуществляли секвенирование РНК *ex vivo* выделенных наивных CD8, TCM CD8 и культивируемых *in vitro* CD8 Т-клетках, которые обрабатывали с использованием Foxo13A-кодирующих NP или контрольных частиц. Идентифицировали сигнатуру TCM, состоящую из лучших 500 генов, которые имеют более высокую или более низкую экспрессию в TCM по сравнению с усредненными CD8 Т-клетками (фиг. 8Е и фиг. 9А). Большинство этих генов скоординировано регулируются в наивных CD8 Т-клетках, что соответствует тесной транскрипционной связи между наивными и TCM (Kaech & Cui, *Immunol* 12, 749-761 (2012)). Обработка с использованием Foxo13A-кодирующих NP вела к дифференциальной экспрессии большого числа генов. Как ожидали, они включали те, которые кодируют ключевой транскрипционный эффектор KLF2 памяти и молекулы поверхности SELL (CD62L), CD28 и S1PR1, все крайне важные медиаторы направленной миграции и функции CD8 TCM (фиг. 8F) (Skon et al., *Nature immunology* 14, 1285-1293 (2013); Voesteanu et al., *Seminars in immunology* 21, 69-77 (2009)).

Наложение генной сигнатуры TCM на вулканную диаграмму Foxo13A обнаруживает выраженную конкордантность транскриптов: гены сигнатуры TCM находились под повышающей регуляцией в Foxo13A-запрограммированных CD8 клетках. Анализ обогащения набора генов подтверждал тесную связь между Foxo13A-регулируемыми транскриптами и TCM-ассоциированной экспрессией гена (фиг. 9В). Вкратце, эти результаты показывают, что Foxo13A-кодирующие NP индуцируют персистирующие изменения в маркерах поверхности и транскрипционное программирование в направлении TCM-подобного фенотипа.

#### Обсуждение.

Этот пример демонстрирует, что надлежащим образом разработанные наноносители мРНК могут временно программировать экспрессию генов в первичных лимфоцитах. В качестве примеров продемонстрированы индуцирование фенотипа памяти и терапевтическое редактирование генома, что показывает, как функцию и/или дифференцировку клеток можно перманентно перепрограммировать через простое добавление биосконструированных наночастиц в культуры Т-клеток. Эта нанотехнологическая платформа не требует особых манипуляций с клетками, так что ее можно легко встраивать в существующие протоколы для изготовления терапевтических Т-клеток без изменения последовательности операций или оборудования, используемых в процессе. Это может быть значимым преимуществом при изготовлении по сравнению с РНК электропорацией, которая в настоящее время является способом, предпочтительным для генной терапии "наскок-и-отход" в Т-клетках (Schumann et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 10437-10442 (2015); Wang et al., *Nucleic Acids Res* 44, e30 (2016); Bai et al., *Cell Discovery*, (2015)). Как изображено на фиг. 2, в дополнение к используемому дорогостоящему оборудованию, для электропорации необходимо несколько замен среды для культивирования, стадий центрифугирования и циклов промывания. Каждая из этих стадий подвержена ошибкам, что увеличивает риск контаминации и снижения выхода лимфоцитов, борющихся с заболеванием. Даже устройства проточной электропорации существующего уровня техники снижают жизнеспособность Т-клеток и, таким образом, выход и качество продукта (Koh et al., *Mol Ther Nucleic Acids* 2, e114 (2013); Liu et al., *Cancer Res* 75, 3596-3607 (2015)). Подход не основан на механической пермеабиллизации клеточных мембран для того, чтобы доставлять трансгены. Вместо этого сконструированные наночастицы связываются с Т-клетками и стимулируют рецепторно-опосредованный эндцитоз - физиологический процесс, который обеспечивает проникновение РНК, которую они несут, без риска для жизнеспособности клеток (фиг. 4С).

Пептиды, проникающие в клетки (СРР), которые представляют собой небольшие белки, которые

облегчают клеткам захват различных молекулярных грузов, также использовали для транспортировки терапевтических средств в первичные Т-клетки (Copolovici, ACS Nano 8, 1972-1994 (2014)). Даже крупные белки, которые несут домены CPP, можно вводить в цитоплазму с использованием этого подхода. Однако специфическое направленное воздействие на выбранные типы клеток невозможно при использовании CPP, а перенос белков относительно не эффективен (Liu et al., Plos one 9, e85755 (2014); Liu et al., Mol Ther Nucleic Acids 4, e232 (2015)). Длительность терапевтического воздействия также сильно зависит от времени полужизни переносимого белка. В отличие от этого, наноносители, нагруженные синтетической мРНК, направляют к конкретным клеткам, и каждая доставляемая молекула РНК служит в качестве матрицы для трансляции нескольких копий белка.

Молекулы CD3 и CD8, на которые направленно воздействовали в этих экспериментах, представляют собой лишь два из многих антигенов, которые можно использовать для того, чтобы избирательно переносить мРНК в лимфоциты. Для того чтобы избирательно модифицировать только определенные субпопуляции Т-клеток, такие как лимфоциты, знакомые с антигеном, следует направленно воздействовать на маркеры активации (например, CD25, 4-1BB, OX40 или CD40L). Также выбор полимера сердцевины и материала покрытия, устранившего заряды, гибкок, и вероятно его следует оптимизировать перед получением в меняющейся клинической обстановке. В отношении первого, тестировали панель катионных полимеров, в том числе гиперразветвленный звездообразный полимер, полиэтиленимин с привитым полиэтиленгликолем и наночастицы мезопористого диоксида кремния, и PBAE 447 выбирали на основании его превосходного эффекта трансфекции и низкой цитотоксичности, опосредованной биоматериалом, в первичных Т-клетках. Последнее является результатом высокой биоразлагаемости этого состава, который имеет время полужизни между 1 и 7 часами в водных условиях (Mangraviti et al., ACS Nano 9, 1236-1249 (2015)). Эти временные рамки идеальны для генной терапии, поскольку полимер конденсирует и эффективно защищает мРНК от разрушения, пока он инкапсулирован в эндосому, но высвобождает ее вскоре после переноса в цитоплазму, таким образом делая возможной транскрипцию кодируемого белка. Важно, что во всех протестированных конструкциях наночастиц отрицательно заряженное покрытие наночастиц необходимо для экранирования положительного заряда полиплексов РНК/PBAE и предотвращения связывания вне мишени.

Помимо Т-клеточной терапии, исследовали использование описанного подхода для изготовления более эффективных продуктов гематopoэтических стволовых клеток (HSC) с использованием наноносителей мРНК, направленных на CD105 (фиг. 10). В частности, стратегии усовершенствования свойств самоподдержания HSC или модуляции их ключевых решений имеют существенную клиническую привлекательность ((Galeev et al., Cell Rep 14, 2988-3000 (2016); Rentas et al., Nature 532, 508-511 (2016)). Подобно области адоптивной Т-клеточной терапии, где фармакологические соединения тестируют в качестве добавок для производства лимфоцитов с увеличенным сроком жизни и/или эффектом *in vivo*, высокопропускным скринингом библиотек идентифицировали низкомолекулярные соединения, которые могут модифицировать размножение стволовых клеток (Nikiforow & Ritz, Cell Stem Cell 18, 10-12 (2016)). Однако многие химические соединения могут лишь ингибировать функцию белка, а их специфичность к желаемой мишени часто спорна (Schenone et al., Nat Chem Biol 9, 232-240 (2013)). Кроме того, белки различных типов нельзя контролировать, используя низкомолекулярные соединения. В отличие от этого, направленные наноносители мРНК могут избирательно индуцировать экспрессию фактически любого известного белка (или комбинаций белков). Кроме того, нуклеотиды, которые они несут, можно легко изготавливать на основании опубликованных последовательностей.

Вкратце, пример демонстрирует, что один реактив наночастиц, добавляемый в культуру лейкоцитов, может эффективно перепрограммировать Т-клетки для терапевтических целей, используя модификацию генов "наскок-и-отход". Эта платформа не повышает сложность изготовления, поскольку она не требует специального оборудования или обучения. Таким образом, по существу можно организовать изготовление генетической клеточной терапии в клиническом масштабе, что обозначает, что лечение пациентов генетически сконструированными Т-клетками может стать более дешевым и более широко применимым.

Как поймет специалист в данной области, каждый вариант осуществления, раскрытый в настоящем описании, может содержать, состоять по существу из или состоять из его конкретно установленного элемента, стадии, ингредиента или компонента. Как используют в настоящем описании, переходный термин "содержать" или "содержит" обозначает включает, но не ограничиваясь этим, и допускает включение не уточненных элементов, стадий, ингредиентов или компонентов, даже в больших количествах. Переходная фраза "состоящий из" исключает любой элемент, стадию, ингредиент или компонент, который не уточнен. Переходная фраза "состоящий по существу из" ограничивает объем варианта осуществления уточненными элементами, стадиями, ингредиентами или компонентами и тем, что не оказывает существенного влияния на вариант осуществления. Как используют в настоящем описании, существенный эффект вызывает статистически значимое снижение способности наноносителя, раскрытого в настоящем описании, менять фенотип выбранного типа клеток после экспозиции выбранного типа клеток для наноносителя в течение 48 ч.

Если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов, свойства, такие как моле-

кулярная масса, условия реакции и так далее, используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "приблизительно". Соответственно, пока не указано иное, числовые параметры, изложенные в описании и приложенной формуле изобретения, представляют собой приближения, которые могут варьировать в зависимости от желаемых свойств, которых стремятся достичь с помощью настоящего изобретения. В крайнем случае и не в качестве попытки ограничить применение доктрины эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр следует толковать по меньшей мере в свете числа приведенных значащих цифр и применяя обычные способы округления. Когда необходима дополнительная прозрачность, термин "приблизительно" имеет значение, обоснованно приписываемое ему специалистом в данной области, когда используют в сочетании с установленным числовым значением или диапазоном, т.е. обозначающее несколько больше или более меньше, чем установленное значение или диапазон, в пределах диапазона  $\Psi 20\%$  от установленного значения;  $\Psi 19\%$  от установленного значения;  $\Psi 18\%$  от установленного значения;  $\Psi 17\%$  от установленного значения;  $\Psi 16\%$  от установленного значения;  $\Psi 15\%$  от установленного значения;  $\Psi 14\%$  от установленного значения;  $\Psi 13\%$  от установленного значения;  $\Psi 12\%$  от установленного значения;  $\Psi 11\%$  от установленного значения;  $\Psi 10\%$  от установленного значения;  $\Psi 9\%$  от установленного значения;  $\Psi 8\%$  от установленного значения;  $\Psi 7\%$  от установленного значения;  $\Psi 6\%$  от установленного значения;  $\Psi 5\%$  от установленного значения;  $\Psi 4\%$  от установленного значения;  $\Psi 3\%$  от установленного значения;  $\Psi 2\%$  от установленного значения; или  $\Psi 1\%$  от установленного значения.

Безотносительно этого, числовые диапазоны и параметры, отражающие широкий объем изобретения, представляют собой приближения, числовые значения, изложенные в конкретных примерах, приведены настолько точно, насколько возможно. Однако любое числовое значение неотъемлемо содержит определенные ошибки, являющиеся неизбежным результатом стандартного отклонения, встречающегося в соответствующих им тестовых измерениях.

Термины в единственном числе, используемые в контексте описания изобретения (в частности, в контексте следующей формулы изобретения), следует толковать как покрывающие единственное и множественное число, если иное не указано в настоящем описании или явно не противоречит контексту. Перечисление диапазонов значений в настоящем описании предназначено лишь для того, чтобы служить в качестве сокращенного способа указания индивидуально каждого отдельного значения, попадающего в диапазон. Если в настоящем описании не указано иное, каждое индивидуальное значение включено в описание, как если бы его индивидуально указали в настоящем описании. Все способы, описанные в настоящем описании можно осуществлять в любом подходящем порядке, если не указано иное в настоящем описании или иным образом явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или приблизительных формулировок (например, "такой как"), предоставленных в настоящем описании, предназначено лишь для того, чтобы лучше освещать изобретение, и не налагает ограничения на объем изобретения, заявленный иным образом. Никакие формулировки в описании не следует толковать в качестве указания на любой не заявленный элемент, важный для практической реализации изобретения.

Группировки альтернативных элементов или вариантов осуществления изобретения, раскрытые в настоящем описании, не следует толковать в качестве ограничений. Каждый элемент группы можно упоминать и заявлять индивидуально или в любой комбинации с другими элементами группы или другими элементами, встречающимися в настоящем описании. Предполагают, что один или более элементов группы можно включать в группу или удалять из нее по причинам удобства и/или патентоспособности. Когда происходит любое такое включение или удаление, то полагают, что описание содержит группу, как модифицировано, таким образом выполняя письменное описание всех групп Маркуша, используемых в приложенной формуле изобретения.

Определенные варианты осуществления по данному изобретению описаны в настоящем описании, в том числе наилучший вариант, известный авторам изобретения для выполнения изобретения. Конечно, вариации в этих описанных вариантах осуществления будут видны специалистам в данной области при прочтении вышеуказанного описания. Автор изобретения ожидает, что специалисты в данной области используют такие вариации в зависимости от ситуации, и авторы изобретения предполагают практическую реализацию изобретения иным образом, нежели конкретно описано в настоящем описании. Соответственно, это изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, перечисленные в формуле изобретения, приложенной здесь, как допускает применяемое право. Кроме того, изобретение охватывает любую комбинацию описанных выше элементов во всех возможных их вариациях, если не указано иное в настоящем описании или явно не противоречит контексту иным образом.

Кроме того, на всем протяжении этого описания дано множество ссылок на патенты и печатные публикации. Каждое из указанных выше ссылок и печатных публикаций индивидуально включено в настоящее описание посредством ссылки в отношении их конкретных цитируемых положений.

В заключение, следует понимать, что варианты осуществления изобретения, раскрытые в настоящем описании, иллюстрируют принципы настоящего изобретения. Другие модификации, которые можно использовать, входят в объем изобретения. Таким образом, в качестве примера, но не ограничения, альтернативные конфигурации по настоящему изобретению можно использовать в соответствии с положе-

ниями в настоящем описании. Соответственно настоящее изобретение не ограничено точно тем, что показано и описано.

Конкретика, приведенная в настоящем описании, служит только в качестве примера и для целей иллюстративного обсуждения предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения и дана ради предоставления того, что полагают наиболее полезным и легко понятным описанием принципов и концептуальных аспектов различных вариантов осуществления изобретения. В связи с этим не пытаются показать структурные детали изобретения более подробно, чем необходимо для фундаментального понимания изобретения, описания в совокупности с рисунками и/или примерами, что проясняет специалистам в данной области, как несколько форм изобретения можно осуществлять на практике.

Определения и объяснения, используемые в настоящем раскрытии, предназначены и предусмотрены в качестве решающих в любой будущей конструкции, пока ясно и однозначно не модифицировано в следующих примерах или когда применение значения делает любую конструкцию бессмысленной или по существу бессмысленной. В случае, когда конструкция термина делает его бессмысленным или по существу бессмысленным, определение следует брать из словаря Уэбстера 3-го издания или словаря, известного специалистам в данной области, такого как Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (ред. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ избирательной модификации выбранной популяции клеток гематопозитического происхождения, включающий:

(i) добавление 12-18 KD-полиглутаминовой кислоты (PGA), связанной с направляющим на выбранную клетку лигандом, который избирательно связывает выбранную популяцию клеток гематопозитического происхождения, в первый раствор, содержащий нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в положительно заряженный полимерный носитель, с образованием второго раствора; и

(ii) инкубацию указанного второго раствора, посредством чего образуются направленные на клетку синтетические наноносители, которые содержат:

(A) нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в положительно заряженный полимерный носитель,

(B) нейтрально или отрицательно заряженное покрытие, содержащее PGA на внешней поверхности положительно заряженного полимерного носителя, и

(C) направляющий на выбранную клетку лиганд, выступающий с внешней поверхности нейтрально или отрицательно заряженного покрытия и связанный с PGA в нейтрально или отрицательно заряженном покрытии; и

(iii) введение образовавшихся направленных на клетку синтетических наноносителей в гетерогенную смесь клеток *ex vivo*, включающих выбранную популяцию клеток гематопозитического происхождения, посредством чего осуществляется избирательная модификация выбранной популяции клеток гематопозитического происхождения.

2. Способ по п.1, где указанный положительно заряженный полимер содержит сложный поли (β-аминоэфир).

3. Способ по п.1, где указанная PGA содержит приблизительно 15 KD-PGA.

4. Способ по п.1, где указанная гетерогенная смесь клеток *ex vivo* находится в бессывороточной среде.

5. Способ по п.1, где указанная нуклеиновая кислота кодирует megaTAL с SEQ ID NO: 1 или имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37.

6. Способ по п.1, где указанная нуклеиновая кислота представляет собой синтетическую мРНК.

7. Способ по п.6, где указанная синтетическая мРНК кодирует средство редактирования генов, выбранное из подобных активатору транскрипции эффекторных нуклеаз (TALEN); megaTAL; и/или нуклеаз с цинковыми пальцами.

8. Способ по п.6, где указанная синтетическая мРНК кодирует изменяющий фенотип белок, выбранный из FOXO1, LKB1, TCF7, EOMES, ID2, TERT, CCR2b и/или CCR4.

9. Способ по п.1, где указанная выбранная популяция клеток гематопозитического происхождения выбрана из Т-клеток, клеток природных киллеров, моноцитов, макрофагов, дендритных клеток, В-клеток или гематопозитических стволовых клеток.

10. Способ по п.1, где указанный направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий CD4 домен или связывающий CD8 домен.

11. Способ по п.1, где перед введением не осуществляют никаких способов отбора клеток или очистки, повышающих процент выбранной популяции клеток по отношению к другим клеткам в указанной гетерогенной смеси.

12. Способ образования направленного на клетку синтетического наноносителя с помощью процесса самосборки, движимого зарядами, включающий:

(i) добавление нуклеиновой кислоты в раствор, содержащий положительно заряженный полимер, и инкубирование указанного раствора при комнатной температуре; и

(ii) добавление 12-18 KD-PGA, связанного с направляющим на выбранную клетку лигандом, в указанный раствор и инкубирование указанного раствора при комнатной температуре;

посредством чего образуется направленный на клетку синтетический наноноситель с помощью процесса самосборки, движимого зарядами, где указанный направленный на клетку синтетический наноноситель содержит

нуклеиновую кислоту, инкапсулированную в положительно заряженный полимерный носитель; нейтрально или отрицательно заряженное покрытие, содержащее 12-18 KD-PGA на внешней поверхности положительно заряженного полимерного носителя; и

направляющий на выбранную клетку лиганд, выступающий с внешней поверхности нейтрально или отрицательно заряженного покрытия и связанный с 12-18 KD-PGA в нейтрально или отрицательно заряженном покрытии.

13. Способ по п.12, где указанный положительно заряженный полимер содержит сложный поли (β-аминоэфир).

14. Способ по п.12, где указанная PGA содержит приблизительно 15 KD-PGA.

15. Способ по п.12, где указанная нуклеиновая кислота кодирует megaTAL с SEQ ID NO: 1 или имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37.

16. Способ по п.12, где указанная нуклеиновая кислота представляет собой синтетическую мРНК.

17. Способ по п.16, где указанная синтетическая мРНК кодирует средство редактирования генов, выбранное из подобных активатору транскрипции эффекторных нуклеаз (TALEN); megaTAL; и/или нуклеаз с цинковыми пальцами.

18. Способ по п.16, где указанная синтетическая мРНК кодирует изменяющий фенотип белок, выбранный из FOXO1, LKB1, TCF7, EOMES, ID2, TERT, CCR2b и/или CCR4.

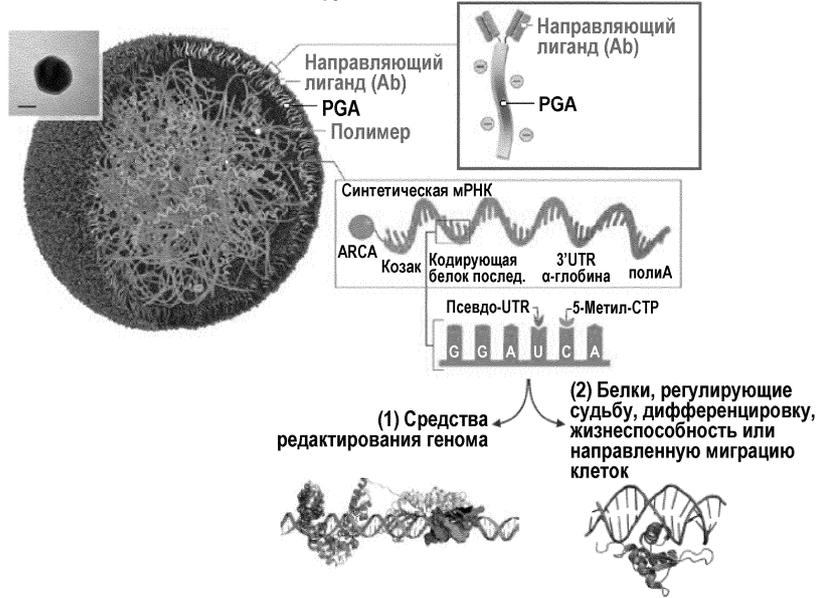
19. Способ по п.12, где указанный направляющий на выбранную клетку лиганд содержит связывающий домен, выбранный из лиганда для рецептора лимфоцита, антитела для рецептора лимфоцита, пептидного аптамера для рецептора лимфоцита, аптамера из нуклеиновой кислоты для рецептора лимфоцита и/или шпигельмера для рецептора лимфоцита.

20. Способ по п.12, где указанный направляющий на выбранную клетку лиганд включает связывающий домен, выбранный из антитела к CD4 или антитела к CD8.

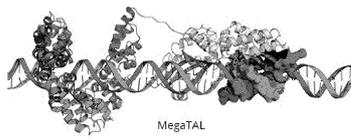


Фиг. 1А

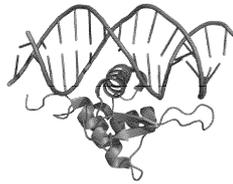
Наночастица с синтетическим мРНК-грузом



Фиг. 1В



Терапевтическая область	Целевой ген
Т-клеточная сигнализация	Фосфатаза Shp1
Иммунная контрольная точка	Рецептор PD1
Безопасность	Эндогенный TCRα
Устойчивость к HIV	CCR5 и/или CXCR4

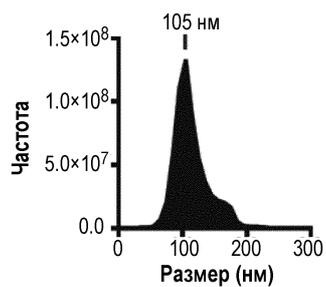


Терапевтическая область	Целевой ген
Т-клеточная память	FOXO1, LKB1
Клеточное старение	TERT (предотвращает укорочение теломеров)
Направленная миграция клеток	Хемокиновый рецептор CCR2b или CCR4

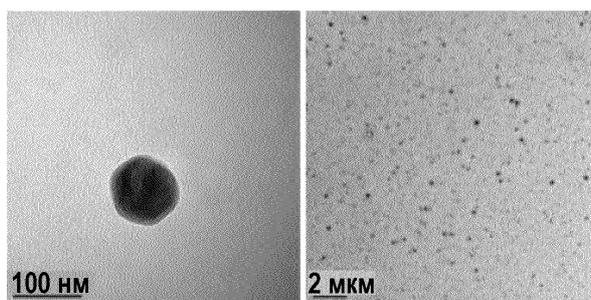
Фиг. 1С

Специфичность антитела	Краситель	Клон	Поставщик
CD34	BV421	561	Biolegend
CD90	APC	5E10	Biolegend
CD105	PE-Cy7	43A3	Biolegend
CD49F	PE	GOH3	Biolegend
CD28	BV 510	CD28-2	Biolegend
CD62L	APC-CY7	DERG56	Biolegend
CD62L	PE-CY5	DERG56	Biolegend
CD45RA	ALEXA 700	HI1000	Biolegend
CCR7	PE	G043H7	Biolegend
CD3	APC	HIT3A	Biolegend
CD3	BV421	HIT3A	Biolegend
CD45R0	PERCP-CY5.5	UCHL1	Biolegend
CD8	BV421	SK1	Biolegend
IL2	BV421	MQ1-17H12	Biolegend
IFN-G	PE	B27	Biolegend
CD19	PE	H1B19	Biolegend
CD133	PE-Vio615	AC133	Miltenyi
Foxo1	--	C29H4	Cell Signal
FAB2 против IG кролика	Alexa 647	--	Cell Signal
StreptTag II	биотин	--	--
Стрептавидин	APC	--	ebioscience
7AAD	--	--	ebioscience

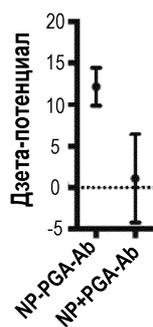
Фиг. 2



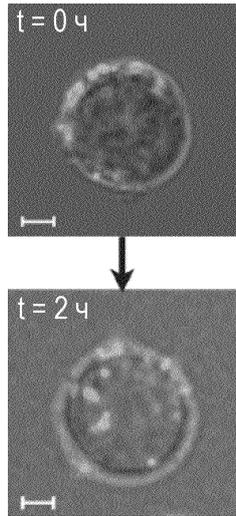
Фиг. 3А



Фиг. 3В

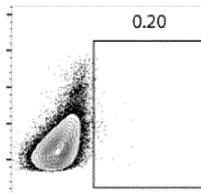


Фиг. 3С

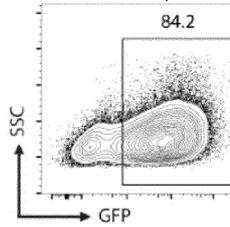


Фиг. 4А

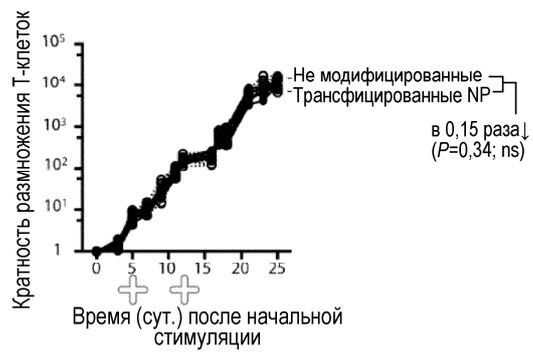
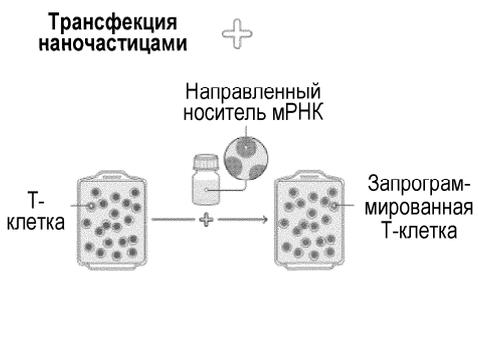
Не трансфицированные



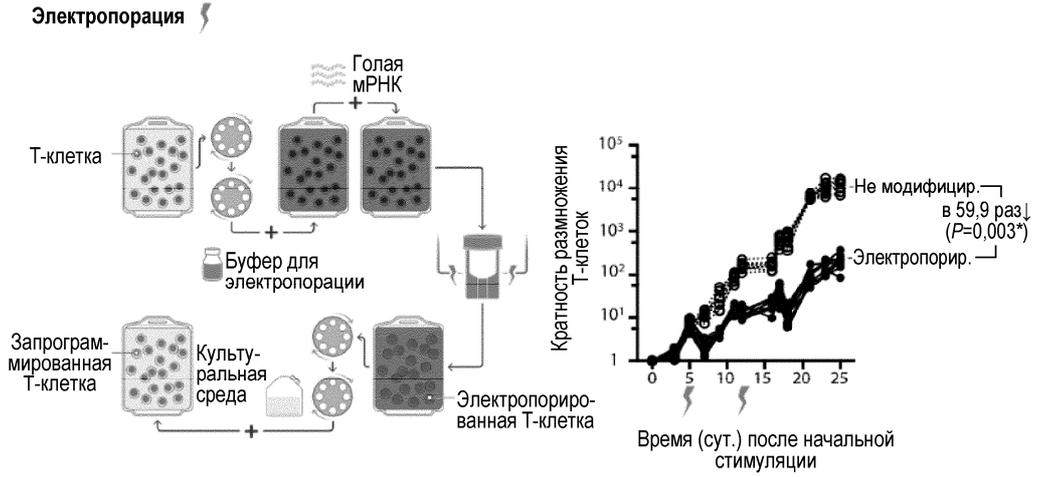
Трансфицированные наночастицами



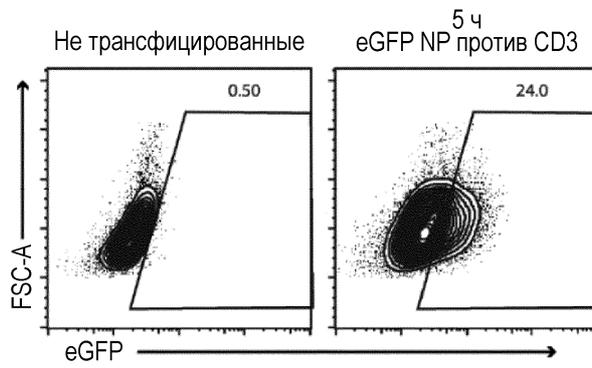
Фиг. 4В



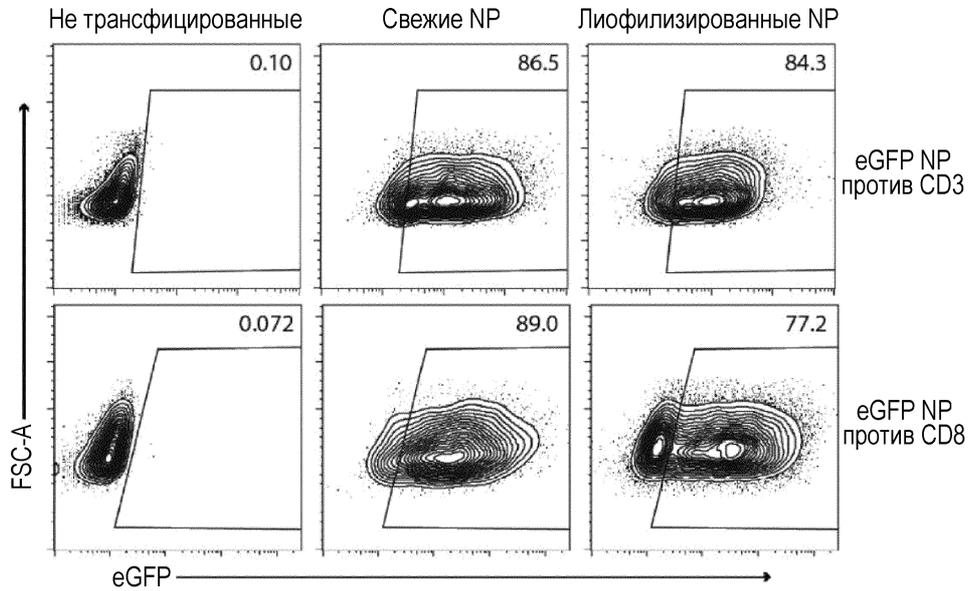
Фиг. 4С



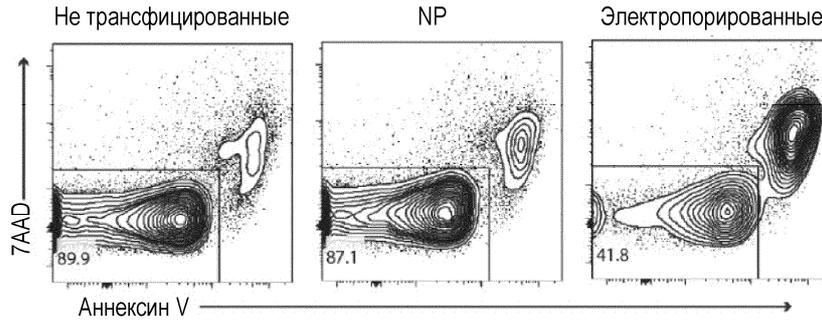
Фиг. 4D



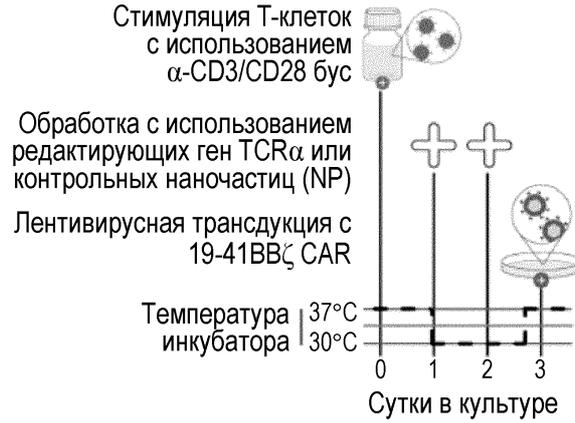
Фиг. 5A



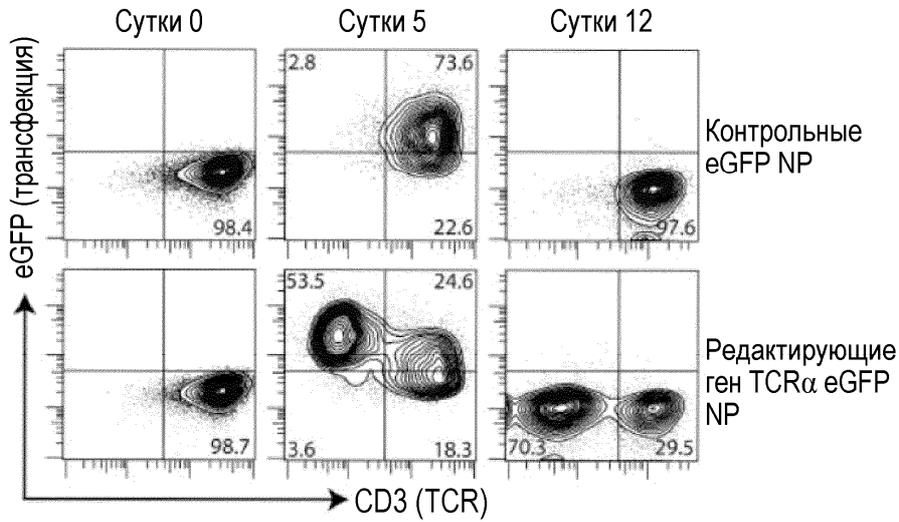
Фиг. 5B



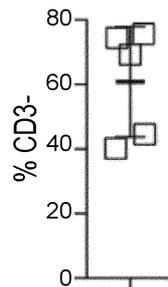
Фиг. 6



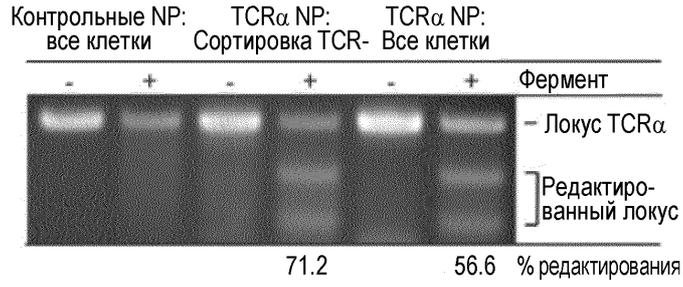
Фиг. 7А



Фиг. 7В

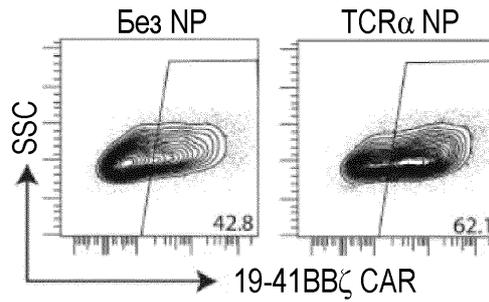


Фиг. 7С

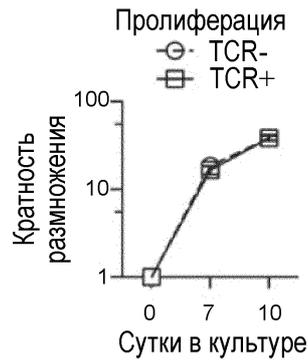


Фиг. 7D

Лентивирусная трансдукция



Фиг. 7E

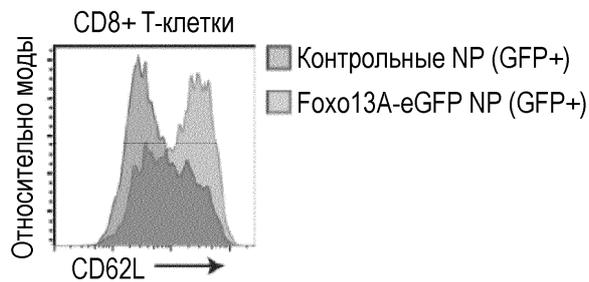
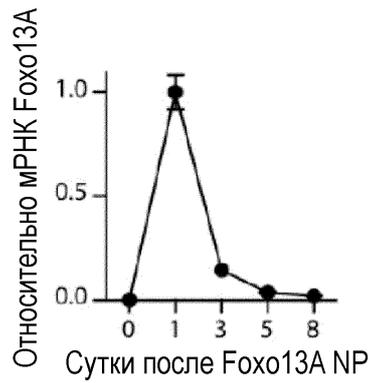
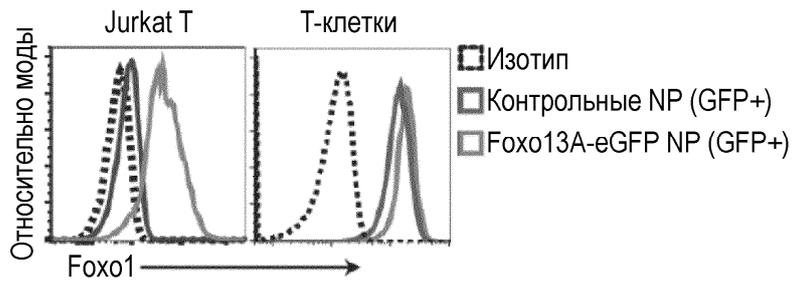


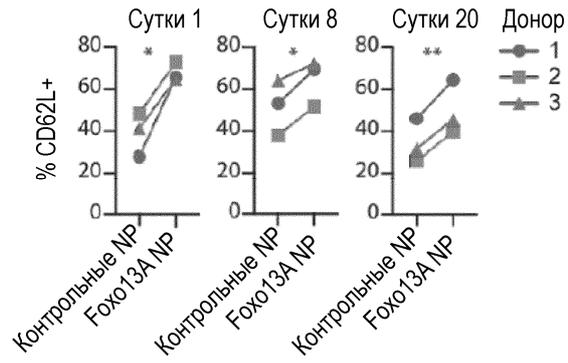
Фиг. 7F

Цитолитическая активность

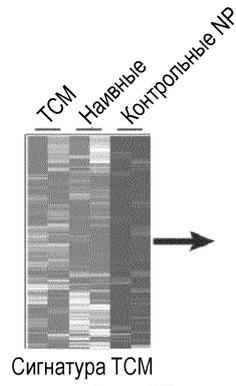


Фиг. 7G

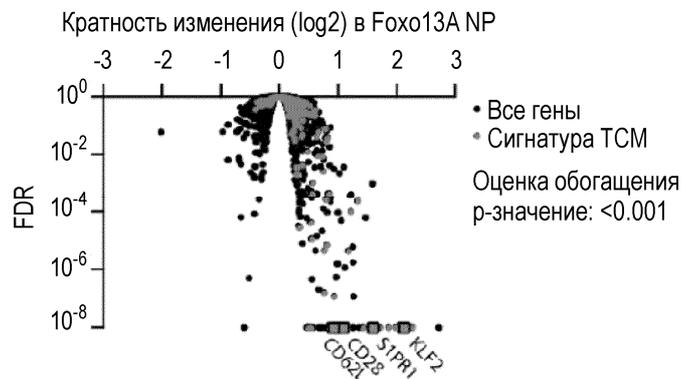




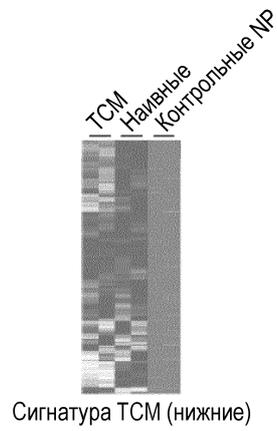
Фиг. 8D



Фиг. 8E

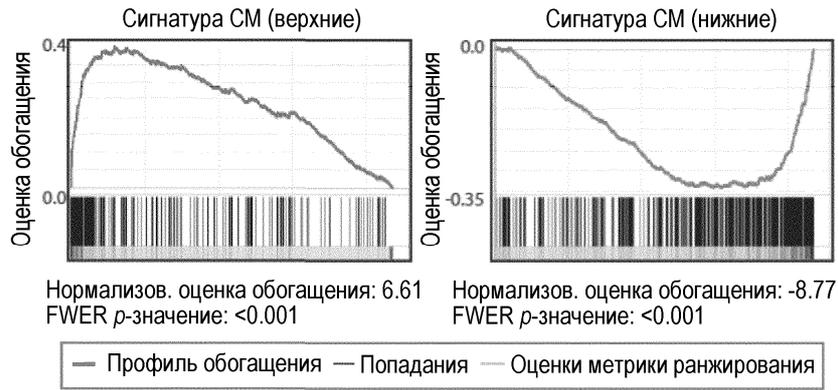


Фиг. 8F

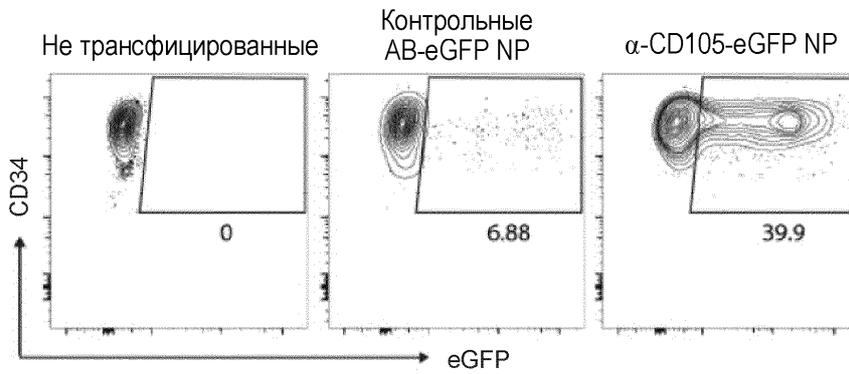


Фиг. 9A

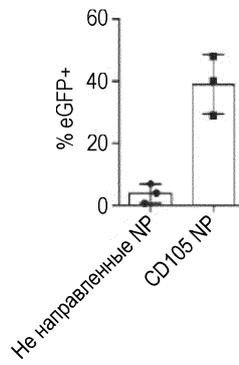
GSEA для генов, дифференциально экспрессированных в клетках, обработанных с использованием Фохо13A NP (сутки 8)



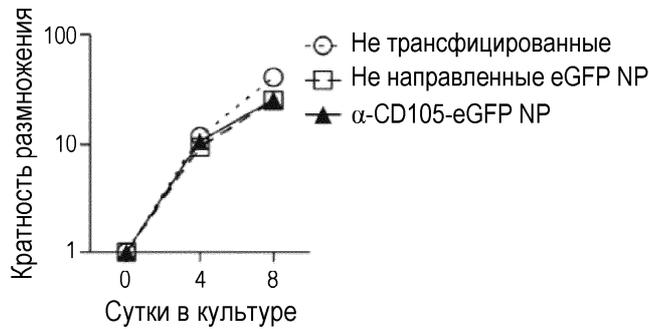
Фиг. 9B



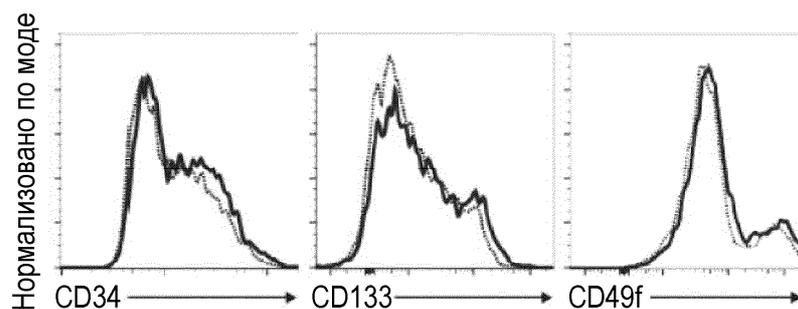
Фиг. 10A



Фиг. 10B



Фиг. 10C



Фиг. 10D

### Образцовая мегаTAL со специфичностью к TCR $\alpha$

MGSCRYPYDVPDYAPPKKRKRKVDLRTLGYSSQQQEKIKPKVSRSTVAQHHEALVGHGFT  
 HAHIVALSQHPAALGTVAVTYQHIIALPEATHEDIVGVGKQWSGARALEALLTDAGELRGP  
 PLQLDTGQLVKIAKRGGVTAMEAVHASRNALTGAPLNLTDPQVVAIASNIGGKQALETVQR  
 LLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQ  
 LETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIAS  
 HDGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTP  
 DQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLC  
 QDHGLTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQALETV  
 QRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQALETV  
 PAMDAVKKGLPHAPELIRRVNRRIGERTSHRVAISRGGSSRRESINPWILTFADAEGSFI  
 LDIRNRNNESENRYRTSLRFQITLHNKDKSILENIQSTWVKGITNSGDRAVMLRVTRFEDLK  
 VIIDHFEKYPLITQKLGDYKLFKQAFSVMENKEHLKENGIKELVRIKAKMNWGLTDELKKAFP  
 ENISKERPLINKNIPNFKWLAGFTSGDGYFGVNLKKVKGNKVYVGLRFSISQHIRDKNLMN  
 SLITYLGCGSIWEKNKSEFSWLEFVVTKFSNDINDKIIPVFQENTLIGVKLEDFEDWCKVAKLIE  
 EKKHLTESGLDEIKKIKLNMNKGRVF\* (SEQ ID NO: 1)

Образцовый ген фосфатазы Shp-1

ACCESSION NM\_080549: Human

actctaaaacgagaagtacaagtgagttcccccaaggggtcgccgcgcctctctctgccccgccccgctgccccagggcagtg  
 agtggcagccccagaactggaccaccgggggtgtagggcgcccgccactgggagctgcatctgaggcttagctcctgagctctg  
 cctgccagactagctgacactcctcattccctgccccctctctccggaagccccagggatgtaggtggtttccacgagacctcagt  
 gggctggatcagagaccctgctcaagggccgaggtgtccacggtagcttctggctcgccccagtcgcaagaaccagggtagcttctg  
 ctccccgtaggggggatcaggtgaccatattcgatccagaactcaggggatttctatgacctgtaggggggagaagtttgcgact  
 ctgacagagctgggtgagtactacactcagcagcaggggtcctgtaggaccgcgacggcaccatcatccactcaaglacccgctgaa  
 ctgctcgcactagtgagaggtgtaccatggccacatgtctgggggagggcagagacctgctgtaggccaagggcagacct  
 ggacgttctgtgctgagagcctcagccagcctggagactctgtcttctgtgctcagtgaccagccaaggctggccagggctccccg  
 tcagggtcaccacatcaaggtcatgtcgaggggtgacgtacacagtggtggttggagacctcgacagcctcacggacctggtgga  
 gcatttcaagaagcgggattgaggagcctcagggcgccttctctacctcgccagccgctactatgcccaggggtgaatggcgtgac  
 attgagaaccaggtgttggactgaacaagaagcaggagtccgaggatacagccaaggctggcttctgggaggagttgagagttgca  
 aagcaggaggtgaagaacttgaccagcgtctggaagggcagcggccagagaacaagggcaagaaccgctacaagaacattctcc  
 ctttgaccacagccagtgatctgacgggacgggacagtaacatcccggttccgactacatcaatgccaactacatcaagaaccagct  
 gcttccgctgtagagaacgctaagacctacatcgccagccagggctgctgtaggaccaggtcaatgacttctggcagatggcgtgca  
 ggagaacagccgtgctatgctatgaccaccgagaggtggagaagggcggaaacaatgctcccatactggccaggggtggccat  
 gcagcgtgcttatggccctactctgtgaccactcggggagcagacacaaccgaatacaactccgtacttacaggtctccccgctg  
 gacaatggagacctgattcgggagatctggcattaccagtagctgagctggccgaccatggggctcccagtgagcctgggggtgctca  
 gcttccctggaccagatcaaccagcggcaggaagctgctcctcagcagggcccatcatctgactgacagcggccatcggccgac  
 aggcaccatcattgtcagatgctcatggagaacatctccaccaagggcctggactgtgacattgacatccagaagaccatccagatg  
 gtgctggcgcagcctcgggcatggtgctgacagcggggcagcagtaagttcatctacgtggccatcgccagttcattgaaaccactaag  
 aagaagctggaggtctcagctgcagaagggccagggagctggagtagcgggaacatcacctatccccagcctagaagaatgccatg  
 ccaagggcctccgcaccctgccaagagcttggagctagtgacgggaccgtggctgctcactgtagagaggggtggccagagggga  
 ctgcccagtcgggctccccctgctgctcctgactgacccaactgctgacttgcacctgcaccggctgcagacacaaggaggat  
 gtgtatgagaacctgcacactaagaacaaagggaggagaaggtgaagaagcagcggctcagcagacaaggagaagagcaagggtt  
 cctcaagaggaagtgagcgggtgctgctcctcaggtggccatgctcagccctgaccctgtggaagcatttccgatggacagactacaac  
 ctgaacctaggagtgccccattcttgaatttaaatggctgcatccccccacctctccctgaccctgtatagcccagccagggccag  
 cagggccaacctctctctgttaataaagccctgggactctgtaaa  
 aa (SEQ ID NO: 2)

Образцовый рецептор PD1 (ген PDCD1)

ACCESSION AY238517: Human

atgcagatcccacagggccccggccagtcgctggggggtgtacaactgggctggcgccagggatggttcttagactcccagaca  
 ggccctggaacccccaccctctccccagccctgctggtgaccgaaggggacaacgccaccttcacctgcagcttccaaacac  
 atcggagagctctgtgtaactgggtaccgatgagcccagcaaccagacggacaagctggccgcttccccagggaccgagc  
 cagccggccagggactgcccgttccgtgtcacacaactgcccacgggctgacttcacatgagcgtggtcagggccggcgcaat  
 gacagcggcacctacctgtggggcatctccctggcccccaagcgcagatcaagagagcctgcccggcagagctcaggggtga  
 cagagagaagggcagaagtgcccacagcccaccagccctcaccagggcagcggccagttccaacccctggtggtggtgt  
 cgtggcggcctgctggcagcctgggtgctgtagtctgggtcctggcgtcatctgctccggggcgcagaggggacaataggagcc  
 aggcgcaccggccagccctgaaggaggaccctcagccgtgctgttctctgtgactatggggagctggatttccagtgccgag  
 agaagacccggagccccctgtgctcctgagcagagcggagtagccaccattgcttcttagcggaaatggcaccctcatcc  
 cccgcccagggctcagctgacggccctggagtgcccagccactgaggcctggagatggacactgcttggccccctgta  
 (SEQ ID NO: 3)

Образцовый ген TCRα

ACCESSION X04954: Human  
atgacatccattcgactgtatttattcctgtggctgagctggacttggatggagagaatgtggagcagatccttcaaccctgagtgc  
caggaggagacagcgcgtttatcaagtgacttattcagacagctgctcaactacttccctggataagcaagaacttgaaaaagacct  
cagctattatagacattcgttcaaatgtggccgaaaagaagaccacgaattgctgttaccattgacaagacagccaaacatttccctct  
acatcacagagacccaactgaagactcggctgtctactctgtgagcaagtaggaaggactctgggggtaccagaagattaccttggaa  
actggaacaagctccaagctatccaatattccagaaccctgac (SEQ ID NO: 4)

Образцовый ген CCR5

ACCESSION U66285: Human  
ttggattacaagtgcaagtcacatctatgacatcaattattatacatcggagccctgcaaaaaaatcaatgtgaagcaaatgcagcccgc  
tcctgcccctactactactcactgtgttcatcttggtttggggcaacatgctggctcatcctcatcctgataaaactgcaaaagcctgaagagcatg  
actgacatctactgctcaacctggccatctgacctgttttcttactgtccccttgggctcactatgctgcccagctgggacttggga  
aatacaatgtgtcaactctgacagggctctatttatagcttcttctggaatcttctcatcctcctgacaatcgaatgacctggctgtc  
tccatgctgtgttgccttaaaagcaggacggctaccttgggggtgacaaagtgtgatcacttgggtgtgctgttggctctcccagg  
aatcatctttaccagatctcaaaaagaaggtcttattacacctgagctctcattttccatacattaagaatagtcacatctggggctgtgctgccc  
gctgctgtatggtcatctgactcgggaatcctaaaaactcgttccgtgtcgaatgagaagaaggagcagggctgtgaggcttattc  
ttaccatcatgattgtttttcttctgggctcctacaacattgtccttctcctgaacaccttcaggaaattttggcctgaaatgtagagc  
tctaacaggttggaccaagctatgaggtgacagagactctgggatgacgcactgctgcatcaacccatcatatgcttctgggggag  
aagttcagaactacctttagtcttctcaaaaagcactgccaacagcttctgcaaatgctgttattttccagcaagaggtcccggagcga  
gcaagctcagtttaccctgactcggggagcaggaaatctgtgggctgtga (SEQ ID NO: 5)

Образцовый ген CXCR4

ACCESSION NM\_001008540: Human  
tttttttctcctctagtgggggggcagaggagttagccaagatgtgacttgaaccctcagcgtctcagtgccctttgttcaacaagaagaa  
ttttgtaattggtctacaaagaagataataatgaagtcactatgggaaagatggggaggagagttgtgattctacattaattctctgtgc  
ccttagcccactactcagaatttctgaagaagcaagcctgaattggttttaaatgctttaaaaaatttttaactgggtaatgctgctgaatt  
ggaagtgaatgctcattccttgcctcttggcagatatacactcagataaactacaccgaggaatgggctcaggggactatgactccatgaa  
ggaaccctgttccgtaagaagaaatgtaattcaataaaatcttctgcccaccatctactccatcatcttctaactggcattgtggcaatgga  
ttggtatcctgtgctggttaccagaagaactgagaagcatgacggacaagtagcagctgacactgtcagtgccgacctcctcttctg  
atcacgcttcccttggcagttgatgctgctggcaaacctgacttgggaacttctatgcaaggcagtcctatcatctacacagtcacacct  
tacagcagttggctcctactcctgactcagctcggaccctgactcctcctggaatcatcaagcaaggtgtgagttgagaacactgt  
gctgaaaaggtgtctatgtggcctggatcctgcccctgctgacttcccacttcttccaactcagtgaggcagatgacag  
atatactgtgaccctctaccaccaatgacttgggtgtgtgttccagtttcagcacatcaggttggcctatcctgctgtaattgctatcctg  
cctgctattgattatcatctcaagctgtcacactccaagggccaccagaagcgaagggccctcaagaccacagtcactcctcatcctggctt  
ctcgcctgttggctcctactacattgggactcagcatcactcctcatcctcctggaatcatcaagcaaggtgtgagttgagaacactgt  
gcacaagtgatttccatcacagggccctagcttcttccactgttctgaacccatcctctatgcttcttggagccaaattaaaacctctg  
cccagcagcactcactctgtgagcagagggctcagcctcaagatcctcacaagaaagcagagtgacattcatctgttccactgag  
tctgagctcaagtttactcactcagtaacacagatgataaaagactttttatacagataaaacttttttaagttacacattttcagataaaaa  
gactgaccaatattgtacagtttttattgctgttggattttctgtgttctttagtttggagtttaattgacttattataaaaatttttttcatattg  
atgtgtcttagcaggacctgtggccaagttctagttgtctgtatgctcgtgttaggactgtagaaaagggaaactgaacattccagagcgtgt  
agtgatcagctaaagctagaatgatccccagctgtttatgcatagataatctcattcccgtggaacgttttctgttctaagagcgtattt  
gctgtagaagatggcactataacaaaagccaaaagtggtatagaaatgctggttttcaagtttcaggagtggttatttcagcacctacag  
gtacagctgttattaagtttaataaaaagtacatgttaacttaaaaaaaaaaaaaaaa (SEQ ID NO: 6)

Образцовый ген FOXO1

ACCESSION BC021981: Human  
ttcctgcttccctcgcgcccctgtcagctggagcggcggcagggctctgcccggcccggcggctctggcggccgtccagtcctgctg  
cggaccccggaggagcctcgtatggtatggcccgcgaagtaagtctgggctcgcgctccactccgcccgcctcctcccagtttccgtcc  
gctcggcgcaccggcttcttccccaaatctcggaccctcctcgcgcccctcccctcgcgcccagtgctgcttccccctctggtc  
tcttggcgtgggggagggcggggggtcaccatggccgagggcggcctcaggtggtgagatcgaccgggactcagccctggcccggc  
cgcgctcgtgacactggcctcggcagggcgggagtttagcagtcacactcggccacctcagcccgccgctggcagcggcgtg  
caaccccgcagccgcccggcctgcccctcggcctcggcctcggcctcagcggcagctcatgagcaactgagctgtctgaggagaga  
cggagacttcccgcagggcggcccgtcctcgtgcccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
acttccagggccggaggcgggctgctgcacccagcggccaccgagcccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
ccccggc  
ctcatccaaggccatcgagagctcggcgggagaagcggctcagcgtctgcagatctacagtggtggtcaagagcgtgcccacttca  
aggataaggtgacagcaacagctcggcggcgtggaagaattcaattcgtcataatctgcccacacagcaagttcattcgtgtgcagaat  
gaaggaactgaaaaagttctgtggtatgctcaatccagaggggtggcaagagcgggaaatcctaggagaagagctgcatccatgga  
caacaacagtaattgtcaagagccgagcggagctgccaagaagaagcatctcctcagctgcccagggaggtgctggggcagacc  
ctggatcacagtttccaatggcctgcaagccctgctcagcaaatgatgacttgataactggagatcatttgcctcgaactagctca  
aatgctagctattatgggagactcaccatattgaccgaacaggtatgctggagaagggagtgctcattctatggtgctaccggcat  
ctgcccgaagatggccttacttaccagctgtctgagataagcaatcccgaaaacatggaatctttggataatctcaaccttctcat  
caccacatattaactgtttcagaccagctcctcactgacccatgatgcagcagcggctgactcgttggcggcaccacacccaggtt  
gaattcaccagcccaactacaaaatatacatatggccaatcagcatgagcccttggcccagatgctatacaaacactcaggac  
aataagtcagttatggaggtatgagtcagataactgtcggcctggactctgaaaggagttgactctgactcctcccataatgacatta  
tgaccacagttgactcgggtagccagcccaacagcggggtctgggcagaacgtcatgatggccctaattcgtgctgcaacctatg  
gcagccaggtatctatacaaaaatgatgaatcccagctccatacccaccctggacatgctcagcagacatctcagttaacggcgtcc  
cctgcccacacggtaagcaccatgcccacacctgggtatgaaccgctgacccaagtgaaagacacctgtacaagtgcctctgccc  
cccagtcagatgagctcctgggggctcctcctcctcgtgagcagctgcaatggcagatggccttcccaccaggaagagctc  
ccaagtgacttgatgctgctcattgagcgttagactgtgacatggaatccatcctggatgacctatggatgagatgattgattt  
aacttggacaatgttggccaacaaagctcccacagctgcaagacaacgacacatagctgggtgctcaggtgagggtagtgagcag  
gttacactaaaagtactcagattgtctgacagcaggaactgagagaagcagtcacaagatgcttccaccaactcccctttatgcttctcggta  
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa (SEQ ID NO: 7)

Образцовый ген LKB1

ACCESSION NM\_000455: Human

gcgtgtcgggcgcggaaggggagggcggccccggggcgccccgagtgaggcgcggggcggaagggagcgcgggtggcg  
 gcactgtgtccgcggccttgatgggtggccccctcgcgctccgctcctccacacgcgcggcgccgcggcgaggggga  
 cgcgccccggggcccgccaccttcgggaacccccggccccggagcctgcggcctgcgcgctcggccgcccggagccccg  
 tggagcccccgccgcccgcgcccccgaccggagcctgagggcactcggggcgggcgcgctcggcagacgtttgcg  
 gggagggggcgctccgggccccggcaccaccttggggctcggggccggctcggggggcccagtgccggccctcgc  
 gggcgccgggagcagaccagccctgagcggagctgttgcccgcgcgggagcctcccgacgccccagcccccgaaacgc  
 tccgccccggccgggagtgccgccccgggaggtccgctcggctcgcgcccgggagcgtttgctcctgggacagggcgtg  
 ggaccggggcgtcgcgagacgccccagcgaagttgggctctccagggtgggggtcccgggggtagcgagctcggacc  
 cggcctgtgggatggcgccccggagaagactgcgctcggccgttccatactgtccgtggcctgaggctccccggaggatgacct  
 agcactgaaaagccccggccggcctccccagggccccggagcgaagttgacctgaccggccgtctccagttctgaggccc  
 gggctccactggaaactcgcgtcagcccgctcccgaccccccgggtgcccgcggtccgagaccctgaccgggcttgactcg  
 cagccgggactgacgtgtagaacaatctgttctgttgaagaagggttttccctctctttggggttttgtgctttttttctttttctgttaa  
 aattttggagaaggaagtcggaacacaaggaaagaccgctcaccgcgactcaggctggcgcgggactccagaccctg  
 ggtccagcatggaggtggtggaccgcagcagctgggcatgttcacggagggcgagctgatgtcgggtggatggacacgttcatcc  
 accgcatcgaactcccgaggtcactaccagcccgccgcaagcgggccaagctcaccgcaagtacctgatgggggactcgt  
 gggggaaggtcttaccgcaaggtgaaggaggtcgtgactcggagacgctgtcaggaggggcctcaagatcctcaagaagaa  
 gaagttcgaaggtcccccaacggggagggccaagctgaagaaggaattcaactactgaggaggttacggcacaataatgcat  
 ccagctggtggtggtatacaacgaagagaagcagaaaaatgtatggtgatggagtactcgtgtgtggcatgcaggaaatgctg  
 gacagcgtcgggagaagcgtttccagtggtccagggccacgggtactctgtcagctgattgacggcctggagtagctcatagcc  
 agggcattgtgcacaaggacatcaagccggggaaccctgctcaccaccggtggcaccctcaaaatctccgacctgggctggc  
 cgaggcactgcaccgctcgcggcgacgacacctgcggaccagccagggtcccggcttccagccgcccagattgccaac  
 ggctggacaccttctccggctcaaggtggacatcgtgctggctgggtcaccctctacaacatcaccacgggtctgtaccocctcga  
 aggggacaacatctacaagttgttgagaacatcgggaaggggagctacgccatcccgggagctgtggcccccgctctctgacct  
 gctgaaaagggtgcttggtacgaaccggccaagaggttctccatccggcagatccggcagcagactggttccggaagaaacat  
 cctcggctgaagcaccagtgcccacccagaccagacaccaaggaccgggtggcgcagcatgactgtggtgctgacttgg  
 aggacctgcacggcgcgagcagggacgacctctcagatcagaggtgacatcatctacactcaggactcagcgtgcccgg  
 acaggtcccagaagaggaggccagtcacaatggacagcgcggggcctccccaggccgtgtgtatgaaaggcagagggcg  
 gcgagctgagcaccaaaatccagggcgagggccggcccccaaccctgccgcaaggcctgtccgcccagcagcaagatcc  
 gccggctgtcggcctgcaagcagcagtgaggctggccgctgcagccgtgtccaggagccccgaggtgccccgcccagggcc  
 ctacgtctctcgggtccgccccctccggagaggtggccgcatgcttctgtcggaccacgcccaggacctccggagcg  
 ccctgacgggcccggcaggggacagcagggaccggcgagccctccccctcggcccccggcagtgcaagcggctgtg  
 acttcgacgccccggcgagccttccggcgggcggtgggagggaggggcctccatgcaactttatgtggagactactggcc  
 ccgcccgtggcctcgtctccgcaagggcggccagcggcctccggcgccccggccgagaccagctggcgggtgtgagaccag  
 gctcctgaccccccatgcatgagcggccacctggaagcgcgcccggcgttggttttgtttggttgggtccatcttcttttttttttt  
 aagaaaaataaaaaggtggtttgagctgtgctgtgaggggtgtttgggagctgctgggtggcaggggggctgtggtgctgggctc  
 acgtcggccgccccttgcgctcgggtcaccctgcttggcggccccggcggagggaccctcacctctcccccaaggccac  
 tgcgctctgggaccagagaaaaccggagcaagcaggtgtgcggtcaatatttatatccagaaaaagaaaaacacgag  
 aaacgccatcggggatggtgagcagcgggggactcggaggggtgcccgtgcccggcgaggccccaatttggcaataaata  
 aagcttgggaagcttgacctgaaaaaa (SEQ ID NO: 8)



gtaagtgcagctttatccacacttgctgatcatctgagcaggacatacatcaacaggcactttgctgataatgtatttaggaagagctt
ttaccttggggttttacatattttctttccaaaatttttcttactaactctgctttagattttctcagaagggtgtgtaatttctgaagaaatgtt
aaggacttaaaaatgaagaggttttttagcatttgagtgaaatgaaatgaaatctgcattatataatcccttctttcatttgatccatttt
ttatcctcccaagagcagatatttacttcccacccccacttttttaacataaagaaaaactgaaactaagaggatgtaatttcac
aacacgaaatagcaaggccctgctcttttaaaatctgagttttaccgccacagccaggtttttccatcacattgacaagagggttga
tctgagtttctggttaggactagtaaaaggtagatttctatagttttaaactctgactgactagggaaacttttctgcatggtggaaat
ttcccaataagccaagagtcagcctaaatgggcccagtgcatctctgctcttctcagcccaacagaccagcattcgggtgtagat
aaccaacaagccttttctttctgggaggtgtttggtgggacaacattaggggttttttttaaggtttctttatattgtagcatgtac
accgctcagaaaatgacaggtaactccatctcccacggattctcctagatcccatcagattgtccctggaggctggtagccgttaac
cttctcccgagcccttctgcaacactttaccctcaagcccgtattataatggcgagagaaccgtgccacagaccaacggcctctttcac
cccaacagagcgaagaggtggccaacctcccagcgggtgctgcacgctgcccagcaactgggaccaacaaactagacatc
agttcctatgaatctgaataacttctagcactgtcccataatggcattaaatcctgcccctcagacatccatgcccctgggtattacc
agaccaaccccttctgcaatggcagggtggggaggctgagggtctaccagaggaaatggcagctggactgtttttgttcttctgctgctg
acaagcccactgttctctgaagatcagctctcaaggagaaagtgaagaggaaatggctctcttgatagacaccccctcc
atcaaatctctagattccaatgattcaggagatataaccagtgcttgaagcgaaggcggtgctctcagcaactccagtaatgaaat
caccctcataaagtgtgagacattaatgctgaagatagtaaagacacctaaaaggcatgggagggtattatgcttttacaa
ctcctaaagaggtattttaacctcaaaaattagtaacttttgcagatggactgtggtgtttttgttcttctgctgctgctgcaaaaag
atgttgcctccactgtatgatcctgtttgtcaattctctaaaagaagggtccaaagcttttgattgctgcaggttaactgaaacaaact
agcattttaaaaaatagattaatggaagactttaggtattttaaaactcgaagggtatccaagggtctgattttattggggagacact
aaccttcaagaagcaggctgtgaactgggtgcccagtgctatcagataggttaaacccttgattctcatttattgtaaatcttaag
aaatagaagcaggtgttaaggtgtttgtctgaaagagggtgctgcttccgttccagaaggagacattttgctgttaccattctgcag
ggcaaaagatactaggcccaggagtcagaanaagctttgtgaaagtgatagttcacctgactttgattcctaaccocccgctttggaa
caagccatgtttgcttagccaggttgctcactgagactgtagcctctgtgtgtgggtggcagtgaggactcaggagag
agcaagctaaaggagtcacaaaaaaagggagaaatgaaagtgacagtgtgttttagatacatatagaat
aatgtgtatattgtacaaatagctacataggtgtctgggataaatgaaactgggttggcttgaagaattgcaactcactaac
agctgcaggggccaaggggagatttcatcctccatgataatgggaatattctgttactcttagatagtaagaatgattcagctactat
gtactaactgaccggttaaggaanaactcctattcactctcttgcgcatccctctcctaactgtaatgtaagaanaactaaac
ctgataccacagctctataggcatttagagatcttgattttatgtacagtctagctatttataaatgtggttcagtaagggaacgga
(SEQ ID NO: 9)

Образцовый ген ID2

NCBI Reference Sequence: NC 000002.12 Human

ggggacgaagggaagctccagcgtgtggccccggcagtgctggataaaaagcccccgcgggctcgggcttactctgagccgag
cccgtgtccaaagcgcagctagctcagcagcggcagcggcctgagctcagggccagccagctcccctcccggtctcgcctccctc
gcggtcagcatgaaagcctcagctccggtgaggtccgttaggaaaaacagcctgtcggaccacagcctgggcatctccggagcaaaa
cccctgtggacagcccgatgagcctgtatacaacatgaacgactgctactccaagctcaaggagctgtgtgccagatccccagaa
caagaaggtgagcaagatggaatcctgcagcagctcagactacatctggacctgcagatgccctggactcgcacccactattgt
cagcctgcatcaccagagaccggcagaaaccaggcgtccaggacgcgctgaccacctcaacacggatagcagatcctgtcctt
gcaggtaagacctgctccgggtcccccccgccgacactcccggctgtctggctgtcactaggagatccgtagcccaga
cgggtgacttctgatgactattaaacttatttctcagaatctgctgtagattgagctgtgctggaattgctagtaagttctgacatgttaatgc
gtcgtcttaaatcgaattgtaccataaacgttttaatgaaactgtgctgtctggaactcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaac
ccttctactaacattgttaacctgactcttactcttcttccaggcttctgaattccctctgagtaattgtcaaatgacagcaaaagcac
tgtgtggctgaataagcgggtgaggtttctgtgcccaccgggtgaaactgcccctcggtgtgtgtgctgctgcgctgcgctgctgtt
gtatctataaaatgtctgatttggtaaatgcatgcttactctgcggtgttacccgtactacattgtctcactagacatgaaggagctgtgctttg
gggtctcgagatcacagaacatttctttaaaggaaatgatgccaataacttactcgaaggcggccgaggaacgtgtgattgctttg
tagcaaatgtaatccctggatcttctcagagctcctctggtactatgaggtactaacctccactgtaattaatcttaccgccaataatccata
gtatcctcctccctaaaactatagctctcgtggattctctgggttagtgaggattgtaccctgtgcttcaacctgtgatgtggatccca
gactccctatctgtaactaaaggctgttttcaatcaataatgttacgagaagcagactgctgctgtagcactgtgttgagatccaa
ataggagattgggtgggaagttttccctgagctctgctattttaaattgtaattgtcgctgcagggcgaggtgtgtgttgcattcggacgcc
agggttggccaactcttgaggtttgtaaatgttcaaactgtgcttctcccggcagctgcccgcctcctgcccctagggtacattctct
aaacatgccccttccccactcttcgaggtgtatgatttcttattctgtgacacacaacaacaacaattcagggaaactctttaaagt
gctgaacttatttcaaccattcacaaggagcaagtgaaatgacacttttaaaaagaaaaaaatggaaggaaaactaagaaat
gatcatctcccagggtgtcttacttgactgtgatattcgtattatgaaaaagacttttaaatgccccttctgcagttggaaggtttcttata
tactattcccaccatggggagcgaanaacttcaaatcaagaagaaatgcccactcaagcagacttgccttttcaaaaggtggagcgtga
ataccgaaggatccagatcagtcacttaaatgaagtctttgtcagaaatacccttttgacacaagcctactgaaatcgtgtatattt
atataaatatattgagtgaaacctgtgaactctttaaattagatttctgtatagtgccagagatgtctattctgcattcaaaagtga
atgatgtacttattcatgtaacttttataaaagtttagtgaactaaccctttatacaaaataaatcaagtggtttattgaaatggtgattgc
ctgcttattcagaggaccagctgtttattatgtatgtataactgaaccaaaataaatacaagttcaaatattgtagactgataag
attataaaaactgtcgaagtcaa (SEQ ID NO: 10)



Образцовый ген CCR2b

ACCESSION NM\_001123396: Human

gttattctctggaacatgaaacattctgtgtctcatatcatgcaaatatcactagtagggagagcagagagtggaatgtccagggtataa  
agaccacaagaataaagaagctcagagctgtagaacaaggagcagatgtacagggttgcctgactcacactcaagggtgataaag  
caagatttcaaaatcctattctgagacctcaaccaatgtacaatgtcctgactggaaaagaagaactatattttctgatttttttc  
aaactctaccattagttgcctgtatctccgctcactttctgcaggaactttattctactctgcatgccaagttctacctagatctgtt  
ggctcagttgctgagaagcctgacataccaggactgctgagacaagccacaagctgaacagagaagaagtggtgaacaaggacgc  
atftccccagtagacacacaatgctgtccacatctgttctcgtttatcagaataccaacagagagcgggtgaagaagtcaccacctttt  
tgattatgattacggtgctccctgataaattgacgtgaagcaaatggggcccaactcctcctcctcactcgtggttcatctttg  
gtttgtgggcaacatgctggtgctcctcatataaactgcaaaaagctgaagtcttgactgacattacctgctcaacctggccatctc  
tgatctgttttcttactctccattgtgggctcactctgctgcaaatgagtggtcttgggaatgcaatgtgcaaatattcacagggtgt  
atcacatcggtattttggggaatcttctcatctcctcctgacaatcgatagatacctggctattgtccatgctgtttgtcttaaaagccag  
gacgggtcacctttgggggtgtagacaagtgatcacctggtgggtgctgtttgctctgcccaggaatcatcttaataatgccaagaa  
gaagattctgttattgtctggtccctatttccacaggatggaataattccacacaataatgaggaacattttggggctgctcctgctg  
gctcatcatggtcatctgactcgggaatcctgaaaacctgctcgtgctgcaaacgagaagaagaggcagagggcagtgagagtc  
atctccacatcatgattgttacttctcttgactccataatattgtcattctcctgaacacctccaggaaattctggcctgagtaactgt  
gaaagccacagctcaactggaccaagccacgcaggtgacagagactctggatgactcactgctcatcaatccatcatctatgctct  
cgttggggagaagtcagaaggtatctcctggttctccgaaagcactccaagcgtctgcaacaatgtccagttttacaggg  
agacagtggtgagtgactcaacaacacgctcactggggagcaggaagctcggctggttataaaacgaggagcagttgat  
tgtgtttataaaggagataacaatctgataaacaactcaaggggttggtaacaatagaaacctgtaaagcagggtgccagg  
aacctcagggtgtgtactaatacagactatgtcaccaatgcatatccaacatgtctcagggaataatccagaaaaactgtggga  
gagacttgactcaccagaagctcatctcagctcctgaaaaatgctcattacctgtgtaactccttttctgactcagaaatctcactc  
aatctctgattctgcaatgtctgaaatcaagggccagctggagggaagaagagaatgtgacagccacagatgaatgggagtgagg  
gatagttgggtcagggtcagaggagaagggagacatgagcatggtgagcctggacaagacaaaggtgagcaaaagggc  
tcacgattcagccaggagatgatactggtccttagccccatctgccacgtgtattaacctgaaggggtcaccaggtcaggagaggtt  
ggacttgcaataaactcggagtttgggtggagccgatgattctctttgataaagtcagatattttgctttattacagttatcatggtcac  
cctatgcaccttacttgaatctatgaatatcatgctccattgtcagatgctctaggccacatccccctgctaaaaatcagaaaat  
tgttataaaaga (SEQ ID NO: 12)

Образцовый ген CCR4

ACCESSION NM\_005508: Human

tctcacaggaagccacgcaccctgaaagccacgggtcctcttagcatctgctcctgagcaagcctggcattgctcacagacctcctc  
agagccgcttcagaaaagcaagctgcttctggtggccagacctgcctgaggagcctgtagagttaaaaaatgaacccccacggatata  
gcagacaccaccctcgtgaaagcatatcacgcaatctatctgtatgaaagtatccccaaagcctgacacaaagaaggcatcaaggcatt  
tggggagctctcctgccccactgtattcctgttttggatttggctgctggaatctgtggttctggctcgttcaaatcaagcggctcag  
tccatgactgatgtacctgctcaacctgcatctggatctgctctcgttttccctccttttgggctactatgagcagaccagtggttt  
tgggctaggctgtgcaagatgatttctgagatgacttggggctttacagtgccatattttgtcatgcatgagcattgatagatacctggca  
attgtgacgcggtgtttcctgagggcaaggacctgactatgggtcatcaccagttggctacatggtcagtggtgtgtcctcctcct  
ggcttctgtcagcactgttatactgagcgcacacatacctactgcaaaaccaagtaactctcaactccacgacgtggaaggttctcagctcc  
ctggaatcaacattctcggattggtgatcccttagggatcatgctgtttgctactcctgatcatcaggacctgacagcattgtaaaatgaga  
agaagaacaaggcgggaagatgatcttgcctggtgctcctcctgggtctgacacctacaacatagtgctctcctagagacctgg  
tggagctagaagctcctcaggactgcaccttgaagatactggactatgccatccagccacagaaactctggctttgtcactgctccttaa  
tccatcatctacttttctggggagaattcgaagatcatcctacagctctcaaaacctgcagggccttttctgctgccaactactgtg  
gctcctccaaatttactctgctgacacccccagctcatctacacgcagtcaccatggatcatgatctccatgatgctctgtagaaaaatgaaat  
gggtaaatgcagagctcaatgaacttccacattcagagcttactaaaattgattttagtaagagattcctgagccaggtcaggaggaaggcct  
acacccacagtgaaagacagcttctcatcctgcaggcagcttttctcccactagacaagctcagcctggcaaggggtcaccctggctga  
ggcatcctctcacaccaggctgctgacggcatgagtcagctgatgagaactctgagcagtgcttgaatgaagttgtaggtaaatgcaa  
ggcaagactatcccttaacctgaactgatgggttctccagagggaattgcagagactggtgatggagtaaatcgctacctttgctgtg  
caaatgggcctct (SEQ ID NO: 13)

scFv против CD19 (VH-VL) FMC63

Cacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgcagcctggcgaccgggtgaccatcagctgcccggccagccaggacat  
 cagcaagtacctgaactggatcagcagaagcccagcgaccctcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgt  
 gccagcccggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctcaacctggaacaggaagatatgccacactcttt  
 gccagcagggaacaacactgcctacaccttggcggcggaacaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcct  
 ggcagcggcgaggcagcaccaggcggaggtgaagctgcaggaaagcggcctggcctggtggccccagccagagcctgagc  
 gtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggatccggcagccccaggaaggcctggaatggctg  
 ggcgtgatctggggcagcagaccactactacaacagcgcctgaagagcggctgaccatcatcaaggacaacagcaagagcc  
 aggtgttccatgaagatgaacagcctgagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaaagcactactactacggcggcagctacgc  
 catggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcag (SEQ ID NO: 28)

scFv против CD19 (VH-VL) FMC63

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFRSGS  
 GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQ  
 ESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIHK  
 DNSKSKVFLKMNSLQDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 29)

Эффекторный домен CD28

cggagcaagcgggagcagaggcggccacagcgactacatgaacatgacccccagaccggcctggccccaccgggaagcactacc  
 agccctacgccccaccagggacttggccctacagaagc (SEQ ID NO: 36)

P28z CAR

Gtggcctcaccgtgaccgcttctgctgctgaacctgctgctggtgagtcgattatcctgggagtggaagaagctgaggtgcag  
 ctgcagcagtcaggaccctgaactgggaaagcctgggactcagtgaggatcctgcaagacttctggatacacattcactgaatatacc  
 atacactgggtgaagcagagccatggaagagccttgagtgattggaacatcaatcctaacaatgggtgaccacactacaatcag  
 aagttcaggacaagccacattgactgtagacaagtcctccagtacagcctacatggagctccgcagcctaacatctgaggtctg  
 cagctctatttgtagcagctggttgaacttggactactggccaaagggaccacggtcaccgctcctcaggtggaggtggatcaggtg  
 gaggtgatctggtggaggtgatctgacattgtagaccagctcacaattcatgtccacatcagtaggagacagggcagcatc  
 atctgaagccagtcagatggtgactgctgtagactggatcaacagaaccaggacaatctcctaaactactgatttattgggcat  
 ccactcggcacactggagtcctgatcgcttcacagcagtgatctgggacagactcactctcaccattactaatgttcagctgaaga  
 ctggcagattattctgicagcaataaacagctatcccctcacggtcgtgctgggaccatgctggacctgaaacggcgccgcatct  
 actactaccaagccagctgctgcaactccctcacctgtgaccctacgggacatctcagccccagagaccagaagattgctggccc  
 cgtggctcagtgaaagggaccgattgactcgcctgtgatttacatctgggcaccctggcggaaatctgctgcccctctgctgctg  
 ctgatcatcactctcatctgctacaatagtagaaggaacagactcctcaaagtactacatgaacatgactccccggagcctgggct  
 cactgaaagccttacagccctacgcccctccagagacttgcagcgtaccgccccagagcaaaattcagcaggagtgagaga  
 ctgctgccaacctgcaggacccaaccagctctacaatgagctcaatctagggcgaagagaggaatgacgtctggagaagaag  
 cgggctcgggatccagagatgggaggcaaacagcagaggaggaggaacccccaggaaggcgtatacaatgactgcagaaag  
 acaagatggcagaagcctacagtgagatcggcacaagggcagaggcggagaggcaaggggcagcatggccttaccaggggt  
 ctgactgcccaccaaggacacctatgatccctgcatatgacaccctggcccctgctaa (SEQ ID NO: 37)

IgG4-Fc

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVWVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD  
 WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
 AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEG  
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 39)

Шарнир-CH2-CH3

ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSDQEDPEVQFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQ  
 REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL  
 YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 40)

Шарнир-CH3

ESKYGPPCPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
 NNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK  
 (SEQ ID NO: 41)

Только шарнир

ESKYGPPCPCP (SEQ ID NO: 42)

Трансмембранный домен CD28

MFVWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 43)

Цитоплазматический домен CD28 (LL в GG)

RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 44)

Цитоплазматический домен 4-1BB

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 45)

Цитоплазматический домен CD3-ζ

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE  
 LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:  
 46)

T2A

LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR (SEQ ID NO: 47)

tEGFR

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRVCNIGIGIEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRGD  
 SFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTQHGFSLAVVSLNITS  
 LGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSP  
 EGCWGPPEPRDCVSCRNVSRGRCVDCNLLGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGR  
 GPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLWVKYADAGHVCHLCHPNCTYGTGPGLEG  
 PTNGPKIPSIATGMVGALLLLVVALGIGLFM (SEQ ID NO: 48)

Strep tag II

WSHPQFEK (SEQ ID NO: 49)

Метка Мус

EQKLISEEDL (SEQ ID NO: 50)

Метка V5

GKPIPNLLGLDST (SEQ ID NO: 51)

Метка FLAG

DYKDDDDK (SEQ ID NO: 52)

Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2