

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202293181 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.02.22

(22) Дата подачи заявки  
2021.05.05

(51) Int. Cl. *A61K 35/12* (2015.01)  
*A61K 35/26* (2015.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)  
*A61P 31/00* (2006.01)  
*A61P 31/12* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

---

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ TCR С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ К CD70 СЛИТЫХ БЕЛКОВ

---

(31) 63/020,196; 63/129,718; 63/147,618;  
63/171,751

(32) 2020.05.05; 2020.12.23; 2021.02.09;  
2021.04.07

(33) US

(86) PCT/US2021/030973

(87) WO 2021/226289 2021.11.11

(88) 2021.12.09

(71) Заявитель:  
TCR2 ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Хофмейстер Роберт, Гутиеррез Дарио,  
Коллард Эндрю, Ладжойе Джейсон,  
Ашминова Вания Э., Лофгрэн Майкл,  
Уотт Эми, Маккарти Деррик, Тайгх  
Роберт (US)

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

(57) В изобретении представлены слитые белки (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащие связывающие CD70 домены, Т-клетки, сконструированные для экспрессии одного или более TFP, антитела, которые специфически связываются с CD70, и способы их применения для лечения заболеваний, включая злокачественное новообразование.

202293181  
A1

202293181

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576423EA/032

### **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ TCR C ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ К CD70 СЛИТЫХ БЕЛКОВ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА**

[1] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/020196, поданной 5 мая 2020 г., предварительной заявке на патент США № 63/129718, поданной 23 декабря 2020 г., предварительной заявке на патент США № 63/147618, поданной 9 февраля 2021 г., и предварительной заявке на патент США № 63/171751, поданной 7 апреля 2021 г., каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

#### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[2] Настоящее изобретение направлено на новые терапевтические средства и способ лечения связанных с CD70 заболеваний и нарушений.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[3] Злокачественные новообразования человека по своей природе состоят из нормальных клеток, которые подверглись генетическому или эпигенетическому преобразованию и превратились в аномальные раковые клетки. При этом раковые клетки начинают экспрессировать белки и другие антигены, отличные от тех, которые экспрессируются нормальными клетками. Эти aberrантные опухолевые антигены могут использоваться врожденной иммунной системой организма для специфического нацеливания и уничтожения раковых клеток. Однако раковые клетки используют различные механизмы для предотвращения успешного нацеливания иммунных клеток, таких как Т- и В-лимфоциты, на раковые клетки.

[4] Большинство пациентов с солидными опухолями на поздних стадиях не поддаются лечению с помощью стандартной терапии. Кроме того, традиционные методы лечения часто имеют серьезные побочные эффекты. Были предприняты многочисленные попытки с целью задействовать иммунную систему пациента для отторжения раковых клеток - такой подход обобщенно именуется иммунотерапией злокачественного новообразования. Однако из-за некоторых препятствий достижение клинической эффективности становится достаточно трудным. Несмотря на то что были выявлены сотни так называемых опухолевых антигенов, они часто являются своими и поэтому могут направить действие иммунотерапии злокачественных новообразований против здоровых тканей, или же они являются слабо иммуногенными. Более того, раковые клетки используют множество механизмов для того, чтобы стать невидимыми или враждебными к инициации и распространению иммунной атаки при иммунотерапии злокачественных новообразований.

[5] Терапия на основе Т-клеток человека основана на использовании обогащенных или модифицированных Т-клеток человека для нацеливания и уничтожения раковых клеток у пациента. Для повышения способности Т-клеток нацеливаться на конкретную

раковую клетку и убивать ее, были разработаны способы конструирования Т-клеток для экспрессии конструкций, которые направляют Т-клетки к конкретной раковой клетке-мишени. Химерные антигенные рецепторы (CAR) и сконструированные Т-клеточные рецепторы (TCR), которые содержат связывающие домены, способные взаимодействовать с конкретным опухолевым антигеном, позволяют Т-клеткам нацеливаться и уничтожать раковые клетки, которые экспрессируют конкретный опухолевый антиген.

[6] Помимо способности генетически модифицированных Т-клеток, экспрессирующих CAR или сконструированный TCR, распознавать и разрушать соответствующие клетки-мишени *in vitro/ex vivo*, успешная терапия пациентов с помощью сконструированных Т-клеток предполагает способность Т-клеток к сильной активации, экспансии, стойкости в течение времени, эффективному нацеливанию на опухоль, снижению и, в случае рецидива заболевания, обеспечению вторичного ответа. Кроме того, терапия на основе CAR, разрабатываемая в настоящее время, связана с высвобождением высоких уровней провоспалительных цитокинов, что связано с дозолимитирующей токсичностью.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[7] Существует явная потребность в разработке улучшенных генетически сконструированных Т-клеток для борьбы с различными злокачественными опухолями человека, включая злокачественные опухоли, экспрессирующие CD70. В данном документе описаны новые слитые белки субъединиц TCR, включая CD3-эпсилон, CD3-гамма и CD3-дельта, а также альфа- и бета-цепей TCR со связывающими доменами, специфическими для CD70, которые могут потенциально преодолеть ограничения существующих подходов.

[8] В данном документе представлены молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), где TFP содержит: (а) субъединицу TCR, содержащую: (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и (ii) трансмембранный домен TCR, (iii) внутриклеточный домен TCR и (b) антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD70; и где субъединица TCR и антигенсвязывающий домен функционально связаны.

[9] В некоторых вариантах осуществления TFP функционально взаимодействует с эндогенным комплексом TCR при экспрессии в Т-клетке.

[10] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен TCR содержит стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3 гамма, CD3 дельта или CD3 эпсилон.

[11] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка, экспрессирующая TFP, проявляет повышенную цитотоксичность по отношению к клетке человека, экспрессирующей CD70, по сравнению с Т-клеткой, не содержащей TFP.

[12] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.

[13] В некоторых вариантах осуществления длина линкера составляет 120 аминокислот или менее.

[14] В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит  $(G_4S)_n$ , где G представляет собой глицин, S представляет собой серин, а n представляет собой целое число от 1 до 10.

[15] В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число от 1 до 4.

[16] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из одной и той же субъединицы TCR.

[17] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из TCR-альфа.

[18] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из TCR-бета.

[19] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из TCR-гамма.

[20] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из TCR-дельта.

[21] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из CD3-эпсилон.

[22] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из CD3-дельта.

[23] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из CD3-гамма.

[24] В некоторых вариантах осуществления все три из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из одной и той же субъединицы TCR.

[25] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR получены из CD3-эпсилон.

[26] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR получены из CD3-дельта.

[27] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR полученные из CD3-гамма.

[28] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR содержат константный домен TCR-альфа.

[29] В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-альфа является мышинным.

[30] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR содержат константный домен TCR-бета.

[31] В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-бета является мышинным.

[32] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR содержат константный домен TCR-гамма.

[33] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR содержат константный домен TCR-дельта.

[34] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой верблюжье антитело или его связывающий фрагмент.

[35] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой мышинное антитело или его связывающий фрагмент.

[36] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой человеческое или гуманизированное антитело или его связывающий фрагмент.

[37] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) или однодоменное антитело (sdAb).

[38] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело (sdAb).

[39] В некоторых вариантах осуществления sdAb представляет собой  $V_{HH}$ .

[40] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с CD70 человека со значением  $K_D$  100 нМ или менее или от около 0,001 нМ до около 100 нМ.

[41] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен не конкурирует с CD27 за связывание с CD70, не ингибирует взаимодействие CD70 с CD27 и/или не связывается с тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27.

[42] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен конкурирует с CD27 за связывание с CD70, ингибирует взаимодействие CD70 с CD27 и/или связывается с тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27.

[43] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывается с эпитопом, который содержится в аминокислотной

последовательности HRDGIYMVNHIQVTLAICSSTTAS (SEQ ID NO:1230).

[44] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит scFv, который имеет по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1207-1222, 1246 и 1247.

[45] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит домен sdAb, который имеет по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1223-1227.

[46] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит переменный домен, содержащий определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3.

[47] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит переменный домен, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 603-620 и 622-688.

[48] В некоторых вариантах осуществления (i) CDR1 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 87-104 и 107-172; (ii) CDR2 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 259-276 и 279-344; и (iii) CDR3 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 431-448 и 451-516.

[49] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит переменный домен, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 618.

[50] В некоторых вариантах осуществления переменный домен имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 618.

[51] В некоторых вариантах осуществления переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 618.

[52] В некоторых вариантах осуществления CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 102, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 274 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 446.

[53] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит домен sdAb, который имеет по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1224-1227.

[54] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

[55] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835.

[56] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), который имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835.

[57] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 783-835.

[58] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен легкой цепи (VL), который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047.

[59] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен легкой цепи (VL), который имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047.

[60] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен легкой цепи (VL), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 995-1047.

[61] В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDRH1), имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 836-888, CDRH2, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 889-941, и CDRH3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 942-994.

[62] В некоторых вариантах осуществления домен VL содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDRL1), имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1048-1100, CDRL2, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1101-1153, и CDRL3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1154-1206.

[63] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1248.

[64] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248.

[65] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1249.

[66] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249.

[67] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1248, и домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1249.

[68] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249.

[69] В некоторых вариантах осуществления домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248 функционально связан через свой C-конец с N-концом домена VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249.

[70] В некоторых вариантах осуществления домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249 функционально связан через свой C-конец с N-концом домена VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248.

[71] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

[72] В некоторых вариантах осуществления VH с последовательностью SEQ ID

NO: 1248 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249 функционально связаны через линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

[73] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1207 или SEQ ID NO: 1208.

[74] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность SEQ ID NO: 1207 или SEQ ID NO: 1208.

[75] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1250.

[76] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250.

[77] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1251.

[78] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251.

[79] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1250, и домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1251.

[80] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251.

[81] В некоторых вариантах осуществления домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250 функционально связан через свой C-конец с N-концом домена VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251.

[82] В некоторых вариантах осуществления домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251 функционально связан через свой C-конец с N-концом домена VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250.

[83] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

[84] В некоторых вариантах осуществления VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251 функционально связаны через линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

[85] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1209 или SEQ ID NO: 1210.

[86] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность SEQ ID NO: 1209 или SEQ ID NO: 1210.

[87] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1252.

[88] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252.

[89] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1253.

[90] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253.

[91] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1252, и домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1253.

[92] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253.

[93] В некоторых вариантах осуществления домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252 функционально связан через свой C-конец с N-концом домена VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253.

[94] В некоторых вариантах осуществления домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253 функционально связан через свой C-конец с N-концом домена VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252.

[95] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

[96] В некоторых вариантах осуществления VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253 функционально связаны через линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

[97] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1246 или SEQ ID NO: 1247.

[98] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность SEQ ID NO: 1246 или SEQ ID NO: 1247.

[99] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывается со вторым эпитопом в пределах аминокислотной последовательности ASRHHPTTLAVGICSPARSISL (SEQ ID NO:1231).

[100] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который содержит CDRH1 с SEQ ID NO: 853, CDRH2 с SEQ ID NO: 906 и CDRH3 с SEQ ID NO: 959, и домен VL, который содержит CDRL1 с SEQ ID NO: 1065, CDRL2 с SEQ ID NO: 1118 и CDRL3 с SEQ ID NO: 1171.

[101] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800.

[102] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 800.

[103] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012.

[104] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1012.

[105] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800, и домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012.

[106] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 800 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1012.

[107] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 782.

[108] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка, экспрессирующая TFP, ингибирует рост опухоли при экспрессии в Т-клетке.

[109] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка, экспрессирующая TFP, имеет повышенный уровень фратрицида по сравнению с TFP, имеющим другой антигенсвязывающий домен.

[110] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка, экспрессирующая TFP, имеет сниженный уровень фратрицида по сравнению с TFP, имеющим другой антигенсвязывающий домен.

[111] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты кодирует любую из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 1233, 1236, 1240 и 1264.

[112] В одном из аспектов настоящего изобретения предложены молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие последовательность, кодирующую антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с CD70.

[113] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела представляет собой верблюжье антитело или его связывающий фрагмент.

[114] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела представляет собой мышье, человеческое или гуманизированное антитело или его связывающий фрагмент.

[115] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) или однодоменное антитело (sdAb).

[116] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела представляет собой однодоменное антитело (sdAb).

[117] В некоторых вариантах осуществления sdAb представляет собой  $V_{HH}$ .

[118] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела связывается с CD70 человека со значением  $K_D$  100 нМ или менее или от около 0,001 нМ

до около 100 нМ.

[119] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела не конкурируют с CD27 за связывание с CD70, не ингибируют взаимодействие CD70 с CD27 и/или не связываются с тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27.

[120] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела конкурируют с CD27 за связывание с CD70, ингибируют взаимодействие CD70 с CD27 и/или связываются с тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27.

[121] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывается с эпитопом, который содержится в аминокислотной последовательности HRDGIYMVNIQVTLAICSSTAS (SEQ ID NO:1230).

[122] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела содержит scFv, который имеет по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1207-1222, 1246 и 1247.

[123] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела содержит домен sdAb, который имеет по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1223-1227.

[124] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела содержат вариабельный домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3.

[125] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела содержат вариабельный домен, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 603-620 и 622-688.

[126] В некоторых вариантах осуществления (i) CDR1 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 87-104 и 107-172; (ii) CDR2 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 259-276 и 279-344; и (iii) CDR3 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 431-448 и 451-516.

[127] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела содержат вариабельный домен, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 618.

[128] В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 618.

[129] В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 618.

[130] В некоторых вариантах осуществления CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 102, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 274 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 446.

[131] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела содержит домен sdAb, который имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1224-1227.

[132] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела представляет собой scFv.

[133] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835.

[134] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), который имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835.

[135] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 783-835.

[136] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен легкой цепи (VL), который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047.

[137] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен легкой цепи (VL), который имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047.

[138] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен легкой цепи (VL), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 995-1047.

[139] В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит CDRH1, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 836-888, CDRH2, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 889-941, и CDRH3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 942-994.

[140] В некоторых вариантах осуществления домен VL содержит CDRL1, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1048-1100, CDRL2, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1101-1153, и CDRL3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1154-1206.

[141] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1248.

[142] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248.

[143] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1249.

[144] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249.

[145] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1248, и домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1249.

[146] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249.

[147] В некоторых вариантах осуществления домен VH с последовательностью

SEQ ID NO: 1248 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249.

[148] В некоторых вариантах осуществления домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248.

[149] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

[150] В некоторых вариантах осуществления VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249 функционально связаны через линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

[151] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1207 или SEQ ID NO: 1208.

[152] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность SEQ ID NO: 1207 или SEQ ID NO: 1208.

[153] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1250.

[154] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250.

[155] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1251.

[156] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251.

[157] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1250, и домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1251.

[158] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251.

[159] В некоторых вариантах осуществления домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251.

[160] В некоторых вариантах осуществления домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250.

[161] Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе, отличающаяся тем, что scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

[162] В некоторых вариантах осуществления VH с последовательностью SEQ ID

NO: 1250 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251 функционально связаны через линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

[163] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1209 или SEQ ID NO: 1210.

[164] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность SEQ ID NO: 1209 или SEQ ID NO: 1210.

[165] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1252.

[166] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252.

[167] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1253.

[168] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253.

[169] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1252, и домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1253.

[170] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253.

[171] В некоторых вариантах осуществления домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252 функционально связан через свой C-конец с N-концом домена VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253.

[172] В некоторых вариантах осуществления домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253 функционально связан через свой C-конец с N-концом домена VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252.

[173] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

[174] В некоторых вариантах осуществления VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253 функционально связаны через линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

[175] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1246 или SEQ ID NO: 1247.

[176] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность SEQ ID NO: 1246 или SEQ ID NO: 1247.

[177] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела специфически связывается со вторым эпитопом в пределах аминокислотной

последовательности ASRHHPTTLAVGICSPARSISL (SEQ ID NO:1231).

[178] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который содержит CDRH1 с SEQ ID NO: 853, CDRH2 с SEQ ID NO: 906 и CDRH3 с SEQ ID NO: 959, и домен VL, который содержит CDRL1 с SEQ ID NO: 1065, CDRL2 с SEQ ID NO: 1118 и CDRL3 с SEQ ID NO: 1171.

[179] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800.

[180] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012.

[181] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит домен VH, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800, и домен VL, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012.

[182] В некоторых вариантах осуществления scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 782.

[183] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе, дополнительно содержит последовательность, кодирующую константный домен TCR.

[184] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела функционально связаны с последовательностью, кодирующей константный домен TCR, образуя таким образом TFP.

[185] В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR представляет собой константный домен TCR-альфа или его часть, константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-альфа или его часть и константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-гамма или его часть, константный домен TCR-дельта или его часть или константный домен TCR-гамма или его часть и константный домен TCR-дельта или его часть.

[186] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе, дополнительно содержит лидерную последовательность.

[187] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из ДНК и РНК.

[188] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

[189] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой кольцевая РНК.

[190] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидный аналог.

[191] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный аналог выбран из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропила,

2'-дезоксидезокси-2'-фтор, 2'-О-аминопропила (2'-О-AP), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-DMAEOE), модифицированного 2'-О-N-метилацетида (2'-О-NMA), закрытой нуклеиновой кислоты (ЗНК), этиленнуклеиновой кислоты (ЭНК), пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК), 1',5'-ангидрогекситоловой нуклеиновой кислоты (АНК), морфолино, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор N3-P5'-фосфорамидита.

[192] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе, дополнительно содержит промотор.

[193] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой транскрибируемую *in vitro* нуклеиновую кислоту.

[194] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую поли(A)-хвост.

[195] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность 3'UTR.

[196] В одном аспекте настоящее изобретение относится к полипептидам, кодируемым молекулой рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе.

[197] В одном аспекте настоящее изобретение относится к векторам, содержащим молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, как описано в данном документе.

[198] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к векторам, содержащим молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе.

[199] В некоторых вариантах осуществления вектор, как описано в данном документе, дополнительно содержит последовательность, кодирующую кРНК, кШРНК или миРНК для снижения эндогенных уровней CD70.

[200] В некоторых вариантах осуществления вектор, как описано в данном документе, дополнительно содержит последовательность, кодирующую ингибирующую молекулу, содержащую первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанную со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.

[201] В некоторых вариантах осуществления вектор, как описано в данном документе, дополнительно содержит последовательность, кодирующую константный домен TCR.

[202] В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR представляет собой константный домен TCR-альфа или его часть, константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-альфа или его часть и константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-гамма или его часть, константный домен TCR-дельта

или его часть или константный домен TCR-гамма или его часть и константный домен TCR-дельта или его часть.

[203] В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, вектора на основе вируса саркомы Рауса (RSV) или ретровирусного вектора.

[204] В некоторых вариантах осуществления вектор, описанный в данном документе, дополнительно содержит промотор.

[205] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой транскрибированный *in vitro* вектор.

[206] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность в векторе дополнительно содержит поли(А)-хвост.

[207] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3'UTR.

[208] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает клетки, содержащие молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, полипептид, описанный в данном документе, или вектор, описанный в данном документе.

[209] В одном аспекте настоящее изобретение относится к клеткам, содержащим молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), где TFP содержит: (a) субъединицу TCR, содержащую: (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и (ii) трансмембранный домен TCR, (iii) внутриклеточный домен TCR и (b) антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD70; и где субъединица TCR и антигенсвязывающий домен функционально связаны.

[210] В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой Т-клетку.

[211] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой Т-клетку человека.

[212] В некоторых вариантах осуществления Т клетка представляет собой CD8+ или CD4+ Т-клетку.

[213] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой человеческую  $\alpha\beta$ -Т-клетку.

[214] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой человеческую  $\gamma\delta$ -Т-клетку.

[215] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой человеческую NKT-клетку.

[216] В одном из аспектов настоящего изобретения предложены Т-клетки, содержащие молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, полипептид, описанный в данном документе, или вектор, описанный в данном документе.

[217] В одном аспекте настоящее изобретение относится к Т-клеткам, содержащим

молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), где TFP содержит: (a) субъединицу TCR, содержащую: (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и (ii) трансмембранный домен TCR, (iii) внутриклеточный домен TCR и (b) антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD70; и где субъединица TCR и антигенсвязывающий домен функционально связаны.

[218] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой Т-клетку человека.

[219] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD8+ или CD4+ Т-клетку.

[220] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой человеческую  $\alpha\beta$ -Т-клетку.

[221] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой человеческую  $\gamma\delta$ -Т-клетку.

[222] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка, как описано в данном документе, дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанную со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.

[223] В некоторых вариантах осуществления ингибирующая молекула содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть PD-1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

[224] В некоторых вариантах осуществления ингибирующая молекула содержит последовательность SEQ ID NO: 1239 или SEQ ID NO: 1244.

[225] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая TFP, и нуклеиновая кислота, кодирующая ингибирующую молекулу, включены в одну молекулу нуклеиновой кислоты.

[226] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая TFP, и нуклеиновая кислота, кодирующая ингибирующую молекулу, включены в две отдельные молекулы нуклеиновой кислоты.

[227] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка, как описано в данном документе, дополнительно содержит вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент.

[228] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая TFP, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в одну молекулу нуклеиновой кислоты.

[229] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая TFP, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в две отдельные молекулы нуклеиновой кислоты.

[230] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая

TFP, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связаны вторым линкером.

[231] В некоторых вариантах осуществления второй линкер содержит сайт расщепления протеазой.

[232] В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления протеазой представляет собой сайт расщепления 2A.

[233] В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления 2A представляет собой сайт расщепления T2A.

[234] В некоторых вариантах осуществления экспрессия IL-15 увеличивает стойкость клеток.

[235] В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 секретируется при экспрессии в клетке или Т-клетке.

[236] В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 1242.

[237] В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно кодирует субъединицу рецептора IL-15 (IL-15R) или ее фрагмент.

[238] В некоторых вариантах осуществления субъединица IL-15R представляет собой IL-15R-альфа (IL-15R $\alpha$ ).

[239] В некоторых вариантах осуществления IL-15 и IL-15R $\alpha$  функционально связаны третьим линкером.

[240] В некоторых вариантах осуществления третий линкер не является расщепляемым линкером.

[241] В некоторых вариантах осуществления третий линкер содержит последовательность, содержащую (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, где G представляет собой глицин, S представляет собой серин, а n представляет собой целое число от 1 до 10.

[242] В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число от 1 до 4.

[243] В некоторых вариантах осуществления n равно 3.

[244] В некоторых вариантах осуществления третий линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 1243.

[245] В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует слитый белок, содержащий полипептид IL-15, связанный с субъединицей IL-15R $\alpha$ .

[246] В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 связан с N-концом субъединицы IL-15R $\alpha$ .

[247] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислоты 30-162 IL-15.

[248] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислоты 31-267 IL-15R $\alpha$ .

[249] В некоторых вариантах осуществления слитый белок дополнительно содержит домен sushi.

[250] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит последовательность SEQ ID NO: 1244.

[251] В некоторых вариантах осуществления слитый белок экспрессируется на клеточной поверхности при экспрессии в клетке или Т-клетке.

[252] В некоторых вариантах осуществления слитый белок секретируется при экспрессии в клетке или Т-клетке.

[253] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка дополнительно содержит третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PD-1.

[254] В некоторых вариантах осуществления полипептид PD-1 функционально связан через свой С-конец с N-концом внутриклеточного домена костимулирующего полипептида.

[255] В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты включена в ту же молекулу нуклеиновой кислоты, что и первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты.

[256] В некоторых вариантах осуществления полипептид PD-1 связан с внутриклеточным доменом костимулирующего полипептида через трансмембранный домен PD-1.

[257] В некоторых вариантах осуществления костимулирующий полипептид выбран из группы, включающей OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD28, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, CD226, FcγRI, FcγRII, и FcγRIII.

[258] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен костимулирующего полипептида содержит по меньшей мере часть CD28.

[259] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1 связаны с внутриклеточным доменом CD28.

[260] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка содержит слитый белок, содержащий внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1, связанный с внутриклеточным доменом CD28, связанным с IL-15Rα.

[261] В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит последовательность SEQ ID NO: 1254 или SEQ ID NO: 1262.

[262] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка дополнительно содержит вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид альфа-рецептора интерлейкина-15 (IL-15Rα) или его фрагмент.

[263] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая TFR, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в одну молекулу нуклеиновой кислоты.

[264] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая

TFR, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в две отдельные молекулы нуклеиновой кислоты.

[265] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая TFR, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связаны вторым линкером.

[266] В некоторых вариантах осуществления второй линкер содержит сайт расщепления протеазой.

[267] В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления протеазой представляет собой сайт расщепления 2A.

[268] В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления 2A представляет собой сайт расщепления T2A.

[269] В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно кодирует PD-1 или его фрагмент.

[270] В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует внеклеточный домен PD-1.

[271] В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует внеклеточный и трансмембранный домен PD-1.

[272] В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно кодирует CD28 или его фрагмент.

[273] В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует внутриклеточный домен CD28.

[274] В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует слитый белок, содержащий внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1, связанный с внутриклеточным доменом CD28, связанным с IL-15R $\alpha$ .

[275] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CD28 связан с внутриклеточным доменом IL-15R $\alpha$ .

[276] В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность SEQ ID NO: 1245.

[277] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты дополнительно содержит третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент.

[278] В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент секретируется при экспрессии в клетке или Т-клетке.

[279] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка секретирует полипептид IL-15 в ответ на агент активации Т-клетки.

[280] В некоторых вариантах осуществления сигналинг IL-15 усиливается в ответ на агент активации Т-клеток.

[281] В некоторых вариантах осуществления агент активации Т-клеток включает антитело к CD3 или его фрагмент, антитело к CD28 или его фрагмент, цитокин, антиген,

который связывает антигенсвязывающий домен TFP, или любые их комбинации.

[282] В некоторых вариантах осуществления TFP функционально взаимодействует с эндогенным комплексом TCR при экспрессии в Т-клетке.

[283] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка имеет функциональное нарушение эндогенного TCR.

[284] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка представляет собой аллогенную клетку или Т-клетку.

[285] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка имеет функциональное нарушение эндогенного гена CD70.

[286] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка имеет функциональное нарушение эндогенного гена СПТА.

[287] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка дополнительно содержит антисмысловую киРНК, кшРНК или миРНК для снижения эндогенных уровней CD70.

[288] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка дополнительно содержит антисмысловую киРНК, кшРНК или миРНК для снижения эндогенных уровней СПТА.

[289] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка дополнительно содержит последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен.

[290] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен.

[291] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая TFP, и последовательность, кодирующая слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен, содержатся в одном и том же опероне.

[292] В некоторых вариантах осуществления удерживающий в ЭПР домен кодируется любой из SEQ ID NO: 756-779.

[293] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая слитый белок, дополнительно содержит трансмембранный домен CD8-альфа между доменом антитела к CD70 и удерживающим в ЭПР доменом.

[294] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая слитый белок, дополнительно содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид CD8-альфа, которая находится на 5'-конце от последовательности, кодирующей домен антитела к CD70.

[295] В некоторых вариантах осуществления домен антитела содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе.

[296] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка содержит экспрессированный на клеточной поверхности CD70, связанный с антителом к CD70.

[297] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, как описано в данном документе.

[298] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 имеет большую аффинность к CD70, чем антитело или антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, как описано в данном документе.

[299] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка дополнительно содержит гетерологичную последовательность, кодирующую ингибирующую молекулу, содержащую первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанную со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.

[300] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка дополнительно содержит гетерологичную последовательность, кодирующую константный домен TCR.

[301] В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR представляет собой константный домен TCR-альфа или его часть, константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-альфа или его часть и константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-гамма или его часть, константный домен TCR-дельта или его часть или константный домен TCR-гамма или его часть и константный домен TCR-дельта или его часть.

[302] В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-альфа или константный домен TCR-бета является мышинным.

[303] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 1233, 1236, 1240 и 1264.

[304] В одном из аспектов в настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие клетку или Т-клетку, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[305] В одном из аспектов в настоящем изобретении предложены способы получения клетки или Т-клетки, как описано в данном документе, причем способ включает: (i) нарушение эндогенного гена CD70 с получением таким образом клетки или Т-клетки, имеющей функциональное нарушение эндогенного гена CD70; и (ii) трансдукции клетки или Т-клетки, имеющей функциональное нарушение эндогенного гена CD70, рекомбинантной нуклеиновой кислотой, как описано в данном документе, или вектором, как описано в данном документе.

[306] В некоторых вариантах осуществления нарушение включает трансдукцию клетки или Т-клетки белком нуклеазой или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок нуклеазу, нацеленный на эндогенный ген CD70.

[307] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает нарушение эндогенного TCR.

[308] В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы получения

клетки или Т-клетки, как описано в данном документе, причем способ, включающий трансдукцию клетки или Т-клетки, включающую нарушение эндогенного гена CD70 рекомбинантной нуклеиновой кислотой, как описано в данном документе, или вектор, как описан в данном документе.

[309] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка дополнительно имеет нарушение эндогенного TCR.

[310] В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы получения клетки или Т-клетки, как описано в данном документе, причем способ включает: (i) трансдукцию клетки или Т-клетки рекомбинантной нуклеиновой кислотой, как описано в данном документе, или вектором, как описано в данном документе; и (ii) приведение в контакт клетки или Т-клетки с антителом к CD70, которое связывается с CD70 на поверхности клетки.

[311] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, как описано в данном документе.

[312] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 имеет большую аффинность к CD70, чем антитело или антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, как описано в данном документе.

[313] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт проводят до трансдукции.

[314] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт проводят за 1 день до трансдукции.

[315] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт проводят после трансдукции.

[316] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт проводят в течение 5 дней после трансдукции.

[317] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, дополнительно включает субкультивирование клеток в среде, не содержащей антитело к CD70, через 4 или более дней после трансдукции.

[318] В некоторых вариантах осуществления субкультивирование включает субкультивирование клеток в среде, не содержащей антитело к CD70, через 7 или более дней после трансдукции.

[319] В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения злокачественного новообразования у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, как описано в данном документе.

[320] В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения злокачественного новообразования у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей (a) клетку или Т-клетку, как описано в данном документе; и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

[321] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование, ассоциированное с повышенной экспрессией CD70.

[322] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе способ дополнительно включает введение субъекту агента, который повышает уровни CD70 в раковых клетках.

[323] В некоторых вариантах осуществления агент, который повышает уровень CD70, представляет собой гипометилирующий агент.

[324] В некоторых вариантах осуществления гипометилирующий агент представляет собой 5-азациитидин или децитабин.

[325] В некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние выбрано из группы, состоящей из Т-клеточной лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), мантийно-клеточной лимфомы (MCL), острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластического синдрома (MDS), вируса Эпштейна-Барра (EBV) + злокачественного новообразования и/или вируса папилломы человека (HPV) + злокачественного новообразования.

[326] В некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние выбрано из группы, состоящей из рака почки, почечно-клеточного рака, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, рака носоглотки, мезотелиомы, глиобластомы, рака тимуса, рака молочной железы, рака головы и рака шеи и рака желудка.

[327] В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[328] В одном из аспектов в настоящем изобретении предложены способы получения клетки или Т-клетки, как описано в данном документе, причем способ включает: (i) нарушение эндогенного гена СПТА с получением таким образом клетки или Т-клетки, имеющей функциональное нарушение эндогенного гена СПТА; и (ii) трансдукции клетки или Т-клетки, имеющей функциональное нарушение эндогенного гена СПТА, рекомбинантной нуклеиновой кислотой, как описано в данном документе, или вектором, как описано в данном документе.

[329] В некоторых вариантах осуществления нарушение включает трансдукцию клетки или Т-клетки белком нуклеазой или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок нуклеазу, нацеленный на эндогенный ген СПТА.

[330] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает нарушение эндогенного TCR.

[331] В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы получения клетки или Т-клетки, как описано в данном документе, причем способ, включающий трансдукцию клетки или Т-клетки, включающую нарушение эндогенного гена СПТА рекомбинантной нуклеиновой кислотой, как описано в данном документе, или вектор, как описан в данном документе.

[332] В некоторых вариантах осуществления клетка или Т-клетка дополнительно

имеет нарушение эндогенного TCR.

[333] В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы получения клетки или Т-клетки, как описано в данном документе, причем способ включает трансдукцию клетки или Т-клетки рекомбинантной нуклеиновой кислотой, как описано в данном документе, или вектором, как описано в данном документе, и последовательностью, кодирующей слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен.

[334] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантную нуклеиновую кислоту или вектор и последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен, трансдуцируют одновременно.

[335] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота или вектор содержат последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен.

[336] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая TFR, и последовательность, кодирующая слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен, содержатся в одном и том же опероне.

[337] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантную нуклеиновую кислоту или вектор трансдуцируют до или после последовательности, кодирующей слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен.

[338] В некоторых вариантах осуществления удерживающий в ЭПР домен кодируется любой из SEQ ID NO: 756-779.

[339] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен, дополнительно содержит трансмембранный домен CD8-альфа между доменом антитела к CD70 и удерживающим в ЭПР доменом.

[340] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен, дополнительно содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид CD8-альфа, которая находится на 5'-конце от последовательности, кодирующей домен антитела к CD70.

[341] В некоторых вариантах осуществления домен антитела содержит антитело к CD70, как описано в данном документе.

#### **ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ**

[342] Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[343] Новые свойства изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание свойств и преимуществ настоящего изобретения будет

получено на основе следующего подробного описания, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы изобретения, и сопроводительных графических материалов, в которых:

[344] **На Фиг. 1** представлено графическое представление анализа ELISA, выявляющего связывание показанных VHH и scFv к CD70 с клетками CHO-CD70 (высокая экспрессия CD70), клетками JVM3 (средне-низкая экспрессия CD70), клетками CHO дикого типа (отрицательный контроль), клетками HL60 (отрицательный контроль).

[345] **На Фиг. 2** показаны результаты анализа связывания Octet для определения аффинности каждого из VHH и scFv к CD70, показанных для CD70.

[346] **На Фиг. 3** показаны результаты анализа эпитоп-специфической сортировки для определения группы каждого из показанных VHH и scFv к CD70, а также для CD27.

[347] **На Фиг. 4** представлена схематическая иллюстрация конкурентного анализа, описанного в Примере 2.

[348] **На Фиг. 5** представлено графическое представление конкурентного анализа, показанного на Фиг. 4 для оценки конкуренции показанных VHH и scFv к CD70 с CD27 за связывание с CD70.

[349] **На Фиг. 6A-6C** представлено графическое представление данных проточной цитометрии, которые отражают экспрессию TFP на клеточной поверхности путем окрашивания антителом к VHH и меткой CD70-Fc в Т-клетках, трансдуцированных TFP, имеющими показанные связывающие компоненты, или в нетрансдуцированных контрольных Т-клетках. **На Фиг. 6A** показано обнаружение с помощью антитела к VHH и метки CD70-Fc. **На Фиг. 6B** показано обнаружение с помощью антитела к VHH. **На Фиг. 6C** показано обнаружение с помощью метки CD70-Fc.

[350] **На Фиг. 7A-7C** представлено графическое представление данных проточной цитометрии, которые отражают CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> положительность в Т-клетках, трансдуцированных TFP, имеющими с показанные связывающие компоненты, или в нетрансдуцированных контрольных Т-клетках. **На Фиг. 7A** показано общее количество Т-клеток. **На Фиг. 7B** показаны TFP<sup>+</sup> Т-клетки. **На Фиг. 7C** показаны TFP<sup>-</sup> Т-клетки.

[351] **На Фиг. 8A-8F** представлено графическое представление данных проточной цитометрии, которые отражают статус памяти Т-клеток путем окрашивания в отношении экспрессии CD45RA и CCR7 на клеточной поверхности в Т-клетках, трансдуцированных TFP, имеющими показанные связывающие компоненты, или в нетрансдуцированных контрольных Т-клетках. **На Фиг. 8A** показано общее количество CD4<sup>+</sup> Т-клеток. **На Фиг. 8B** показаны TFP<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клетки. **На Фиг. 8C** показаны TFP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клетки. **На Фиг. 8D** показано общее количество CD8<sup>+</sup> Т-клеток. **На Фиг. 8E** показаны TFP<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клетки. **На Фиг. 8F** показаны TFP<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

[352] **На Фиг. 9A-9D** представлено графическое представление данных проточной цитометрии, которые отражают экспрессию CD45RA и CD27 на клеточной поверхности в Т-клетках, трансдуцированных TFP с показанными связывающими компонентами, или в нетрансдуцированных контрольных Т-клетках. **На Фиг. 9A** и **9B** показаны TFP<sup>-</sup> Т-клетки.

**На Фиг. 9С и 9D** показаны TFP+ Т-клетки.

[353] На Фиг. 10 представлена серия графиков, показывающих пролиферацию Т-клеток, трансдуцированных TFP с показанными связывающими компонентами, или нетрансдуцированных контрольных Т-клеток от трех доноров при совместном культивировании в течение 24 часов с клетками СНО-ДТ или клетками ТНР-1 при соотношении эффектор:клетки-мишени 9:1, 3:1 и 1:1.

[354] На Фиг. 11 представлена серия графиков, показывающих цитотоксичность Т-клеток, трансдуцированных TFP с показанными связывающими компонентами, или нетрансдуцированных контрольных Т-клеток от трех доноров при совместном культивировании в течение 24 часов с клетками СНО-ДТ или клетками ТНР-1 при соотношении эффектор:клетки-мишени 9:1, 3:1 и 1:1.

[355] На **Фиг. 12А и 12В** представлена серия графиков, показывающих секрецию цитокинов Т-клетками, трансдуцированными TFP с показанными связывающими компонентами, или нетрансдуцированными контрольными Т-клетками от трех доноров при совместном культивировании в течение 24 часов с клетками СНО-ДТ или клетками ТНР-1 при соотношении эффектор:клетки-мишени 9:1, 3:1 и 1:1. **На Фиг. 12А** показаны уровни IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , и IL-2. **На Фиг. 12В** показан GM-CSF.

[356] На Фиг. 13 представлена серия графиков, показывающих экспансию и жизнеспособность Т-клеток, трансдуцированных показанными TFP, и нетрансдуцированных контролей, полученных в соответствии со способами, описанными в Примере 9, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70 после 10 дней экспансии.

[357] На Фиг. 14 показан график, иллюстрирующий эффективность трансдукции клеток, трансдуцированных в соответствии со способами, описанными в примере 9, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70 с показанными TFP.

[358] На Фиг. 15 представлена серия графиков, показывающих соотношение CD4+ и CD8+ Т-клеток, когда TFP+ Т-клетки получают в соответствии со способами, описанными в Примере 9, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70.

[359] **На Фиг. 16А и 16В** представлена серия графиков, иллюстрирующих фенотип памяти Т-клеток, когда TFP+ Т-клетки получают в соответствии со способами, описанными в Примере 9, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70. **На Фиг. 16А** показаны CD4+ Т-клетки, а на **Фиг. 16В** показаны CD8+ Т-клетки.

[360] На Фиг. 17 представлена серия графиков, показывающих соотношение CCR7+ CD4+ и CD8+ Т-клеток, когда TFP+ Т-клетки получают в соответствии со способами, описанными в Примере 9, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70.

[361] На Фиг. 18 представлена серия графиков, показывающих соотношение CCR69+ CD4+ и CD8+ Т-клеток, когда TFP+ Т-клетки получают в соответствии со способами, описанными в Примере 9, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70.

[362] **На Фиг. 19А и 19В** представлена серия графиков, иллюстрирующих соотношение CD27+ и CD70+ Т-клеток, когда TFP+ Т-клетки получают в соответствии со способами, описанными в Примере 9, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70. **На**

**Фиг. 19А** показаны CD4<sup>+</sup> Т-клетки, а на **Фиг. 19В** показаны CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

[363] На **Фиг. 20** представлена серия графиков, иллюстрирующих секвенирование РНК на TFP<sup>+</sup> Т-клетках, полученных в соответствии со способами, описанными в Примере 9, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70.

[364] На **Фиг. 21** представлена серия графиков, иллюстрирующих цитотоксичность TFP<sup>+</sup> Т-клеток, полученных в соответствии со способами, описанными в Примере 9, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70. Клетки совместно культивируют при соотношении мишень:эффектор 1:1, 3:1 или 9:1. CD70-отрицательные клетки K562, CD70-положительные клетки AML THP-1 или CD70-положительные клетки RCC 786-О модифицировали для сверхэкспрессии люциферазы светлячка, а лизис клеток определяют по люциферазной активности живых клеток.

[365] На **Фиг. 22А-22Н** представлена серия графиков, иллюстрирующих экспрессию цитокинов показанными TFP<sup>+</sup> Т-клетками при совместном культивировании с CD70-отрицательными клетками K562, CD70-положительными клетками AML THP-1 или CD70-положительными клетками RCC 786-О при соотношении мишень:эффектор 1:1, 3:1 или 9:1 в течение 24 или 72 часов. TFP<sup>+</sup> Т-клетки получали в соответствии со способами, описанными в **Примере 9**, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70. Уровни GM-CSF показаны через 24 часа (**Фиг. 22А**) и 72 часа (**Фиг. 22В**). Уровни IFN- $\gamma$  показаны через 24 часа (**Фиг. 22С**) и 72 часа (**Фиг. 22D**). Уровни IL-2 показаны через 24 часа (**Фиг. 22Е**) и 72 часа (**Фиг. 22F**). Уровни TNF- $\alpha$  показаны через 24 часа (**Фиг. 22G**) и 72 часа (**Фиг. 22H**).

[366] На **Фиг. 23А** и **23В** представлена серия графиков, иллюстрирующих долю клеток TFP<sup>+</sup> CD70<sup>+</sup> и CD70<sup>-</sup> через 7 дней (**Фиг. 23А**) и 9 дней (**Фиг. 23В**) после редактирования CRISPR для нокаута CD70.

[367] На **Фиг. 24** показан график и гистограмма, иллюстрирующая эффективность трансдукции клеток, трансдуцированных показанным TFP, в соответствии со способами, описанными в Примере 10, в неотредактированных и отредактированных CRISPR CD70 клетках.

[368] На **Фиг. 25** представлена серия графиков, показывающая долю CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, когда TFP<sup>+</sup> Т-клетки получают в соответствии со способами, описанными в Примере 10, в неотредактированных и отредактированных CRISPR CD70 клетках.

[369] На **Фиг. 26** представлена серия графиков, иллюстрирующих соотношение CD27<sup>+</sup> и CD70<sup>+</sup> Т-клеток, когда TFP<sup>+</sup> Т-клетки получают в соответствии со способами, описанными в Примере 10, в неотредактированных и отредактированных CRISPR CD70 клетках.

[370] На **Фиг. 27А** и **27В** представлена серия графиков, иллюстрирующих фенотип памяти Т-клеток, когда TFP<sup>+</sup> Т-клетки получают в соответствии со способами, описанными в Примере 10, в неотредактированных и отредактированных CRISPR CD70 клетках. На **Фиг. 27А** показаны CD4<sup>+</sup> Т-клетки, а на **Фиг. 27В** показаны CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

[371] На Фиг. 28 представлена серия графиков, показывающая долю CCR69+ CD4+ и CD8+ Т-клеток, когда TFP+ Т-клетки получают в соответствии со способами, описанными в Примере 10, в неотредактированных и отредактированных CRISPR CD70 клетках.

[372] **На Фиг. 29** представлена серия графиков, показывающих обнаружение экспрессии TFP 70-001 в клетках Jurkat дикого типа и в клетках с нокаутом по CD3ε с помощью CD70-биотин/SA-PE и анти-VНН-AF488 с помощью проточной цитометрии. TRuС, созданные с использованием вируса VIN70069 (титр 6.5E7 ME)

[373] На Фиг. 30 представлена серия графиков, иллюстрирующих долю клеток VНН+ и CD69+ Jurkat (дикого типа или нокаутных по CD3ε), трансдуцированных TFP 70-001 при совместном культивировании в соотношении 1:1 с CD70-отрицательными клетками K562, CD70-положительными клетками AML THP-1, CD70-положительными клетками JVM3 или контролем без клеток-мишеней в течение 16 часов в присутствии или в отсутствие 5 мкМ антитела к CD70 41D12.

[374] На Фиг. 31 представлено графическое представление данных диаграммы проточной цитометрии, показанной на Фиг. 30.

[375] На Фиг. 32 представлена серия графиков, иллюстрирующих долю VНН+ и CD69+ клеток, нокаутированных по CD3ε, клеток Jurkat, трансдуцированных TFP 70-001, при совместном культивировании в соотношении 1:1 с CD70-отрицательными клетками K562, CD70-положительными клетками AML THP-1, CD70-положительными клетками JVM3 или контролем без клеток-мишеней в течение 16 часов в присутствии или в отсутствие антител к CD70 (5 мкМ 1F6-hFc или 70-001-hFc или 10 мкМ 41D12).

[376] На Фиг. 33 представлено графическое представление данных диаграммы проточной цитометрии, показанной на Фиг. 32.

[377] На Фиг. 34 представлена схематическая иллюстрация анализов ELISA, используемых для измерения способности CD27 блокировать связывание CD70, которая была измерена с помощью ELISA, описанного в Примере 12.

[378] **На Фиг. 35** представлен график, показывающий титрование Octet для измерения аффинности антител scFv к CD70 1885 (B08), 1985 (A11) и 1867 (C10) в отношении CD70. Группа scFv была обнаружена путем пэннинга наивной полностью человеческой библиотеки scFv, и часть из них была преобразована в TRuС и охарактеризована в данном документе.

[379] **На Фиг. 36** показаны результаты анализа эпитоп-специфической сортировки для определения группы каждого из показанных VНН и scFv к CD70, а также для CD27.

[380] **На Фиг. 37А-37С** показаны результаты анализа картирования эпитопов. **На Фиг. 37А** представлен график, показывающий результаты картирования эпитопов для показанных антител VНН, а на Фиг. 37В представлен график, показывающий результаты картирования эпитопов показанных антител scFv. **На Фиг. 37С** представлена схема, обобщающая данные об эпитоп-специфической сортировке и картировании эпитопов с **Фиг. 36, Фиг. 37А и Фиг. 37В.**

[381] На Фиг. 38 представлена серия графиков, показывающих данные проточной цитометрии, которые отражают экспрессию CD69 и эффективность трансдукции, как определено по экспрессии CD3 в клетках Jurkat с нокаутом по CD3ε, трансдуцированных TFP, имеющими показанные связывающие компоненты scFv, или нетрансдуцированных контрольных Т-клетках.

[382] На Фиг. 39А и 39В представлена серия графиков, показывающих данные проточной цитометрии, которые отражают экспрессию CD3 и экспрессию CD69 в клетках Jurkat с нокаутом CD3ε, трансдуцированных TFP, имеющими показанные связывающие компоненты scFv, после совместного культивирования с клетками K562, THP-1, ACHN или клетками-мишенями 786-О в соотношении 1:1 в течение 24 часов. На Фиг. 39А показаны связывающие компоненты scFv в ориентации vLvH, а на Фиг. 39В показаны связывающие компоненты scFv в ориентации vHvL.

[383] На Фиг. 40 представлен график, показывающий секрецию цитокинов TNF-α, GM-CSF и IL-2 клетками Jurkat с нокаутом по CD3ε, трансдуцированными TFP, имеющими показанные связывающие компоненты scFv, после совместного культивирования с клетками K562, THP-1, ACHN или клетками-мишенями 786-О в соотношении 1:1 в течение 24 часов. CD70.TFP-Т-клетки культивируют совместно с клетками CD70-K562 или CD70+ TFP+ клетками, клетками ACHN или 786-0.

[384] На Фиг. 41 представлен график, показывающий экспансию Т-клеток, трансдуцированных TFP к CD 70, имеющими показанные связывающие компоненты scFv, TFP 70-001 к CD70 или TC-110.

[385] На Фиг. 42 представлен график, иллюстрирующий эффективность трансдукции клеток, трансдуцированных показанными конструкциями TFP, как указано в Примере 16.

[386] На Фиг. 43 представлена серия графиков, показывающих долю CD4+ и CD8+ Т-клеток в популяциях Т-клеток, трансдуцированных показанными TFP, как указано в Примере 16, или нетрансдуцированных контрольных Т-клеток. Некоторые TRuS CD70 демонстрируют такое же соотношение CD4/CD8, как NT и TC-110.

[387] На Фиг. 44 представлен график, показывающий долю CD69+ Т-клеток, трансдуцированных TFP, имеющими связывающие компоненты, как указано в Примере 16, или нетрансдуцированных контрольных Т-клеток.

[388] На Фиг. 45 представлен график, показывающий фенотип памяти, определенный с помощью проточной цитометрии, которая позволяет определить экспрессию CD45RA и CD27 на клеточной поверхности в Т-клетках, трансдуцированных TFP, имеющими связывающие компоненты, как указано в Примере 16, или в нетрансдуцированных контрольных Т-клетках.

[389] На Фиг. 46 представлена сводная таблица данных, показанных на Фиг. 42-45.

[390] На Фиг. 47 представлена серия графиков, показывающих обнаружение поверхностной экспрессии CD70 в линиях клеток THP-1, ACHN и 786-О.

[391] На Фиг. 48 представлена серия графиков, демонстрирующих

цитотоксичность Т-клеток, трансдуцированных TFP с показанными связывающими компонентами, или нетрансдуцированных контрольных Т-клеток от одного репрезентативного донора при совместном культивировании в течение 24 часов с клетками THP-1, ACHN, 786-О или К562 в соотношении 3:1, 1:1 или 1:3.

[392] **На Фиг. 49А-49D** представлена серия графиков, показывающих продукцию цитокинов Т-клетками, трансдуцированными TFP, имеющими показанные связывающие компоненты, или нетрансдуцированными контрольными Т-клетками от одного репрезентативного донора при совместном культивировании в течение 24 часов с клетками THP-1, ACHN, 786-О или К562 в соотношении 3:1, 1:1 или 1:3. Измеряли IFN- $\gamma$  (**Фиг. 49А**), IL-2 (**Фиг. 49В**), TNF- $\alpha$  (**Фиг. 49С**), и GM-CSF (**Фиг. 49D**).

[393] **На Фиг. 50** представлен график, показывающий экспансию Т-клеток от трех доноров, трансдуцированных TFP к CD 70, имеющих показанные связывающие компоненты scFv или гуманизированные VHH, или TFP 70-001 к CD70 (P3E8), TC-110 или нетрансдуцированных контролей.

[394] **На Фиг. 51** представлена серия графиков, показывающих экспрессию CD70 на клеточной поверхности и эффективность трансдукции, определенные путем обнаружения экспрессии VHH в Т-клетках от трех доноров, трансдуцированных TFP к CD 70, имеющими показанные связывающие компоненты scFv или гуманизированные VHH, или TFP 70-001 к CD70 (P3E8), TC-110, или нетрансдуцированных контролей.

[395] **На Фиг. 52** представлена серия графиков, показывающих данные проточной цитометрии, которые отражают CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>-положительность в Т-клетках от трех доноров, трансдуцированных TFP к CD 70, имеющими показанные связывающие компоненты scFv или гуманизированные VHH, или TFP 70-001 к CD70 (P3E8), TC-110, или нетрансдуцированных контролей.

[396] **На Фиг. 53** представлена серия графиков, показывающих фенотип памяти, определенный с помощью проточной цитометрии, которая позволяет определить экспрессию CD45RA и CD27 на клеточной поверхности в Т-клетках от двух доноров, трансдуцированных TFP к CD 70, имеющими показанные связывающие компоненты scFv или гуманизированные VHH, или TFP 70-001 к CD70 (P3E8), TC-110 или нетрансдуцированных контролей.

[397] **На Фиг. 54** представлена серия графиков, показывающих данные проточной цитометрии, которые отражают экспрессию CD69 на клеточной поверхности в Т-клетках от трех доноров, трансдуцированных TFP к CD 70, имеющими показанные связывающие компоненты scFv или гуманизированные VHH, или TFP 70-001 к CD70 (P3E8), TC-110, или нетрансдуцированных контролей.

[398] **На Фиг. 55** представлена серия графиков, показывающих цитотоксичность Т-клеток, трансдуцированных TFP, имеющими показанные связывающие компоненты, или нетрансдуцированных контрольных Т-клеток от одного репрезентативного донора при совместном культивировании в течение 24 часов с клетками THP-1, ACHN, 786-О или К562 в соотношении 3:1, 1:1 или 1:3.

[399] **На Фиг. 56** представлена серия графиков, показывающих продукцию цитокинов Т-клетками, трансдуцированными TFP, имеющими показанные связывающие компоненты, или нетрансдуцированными контрольными Т-клетками от одного репрезентативного донора при совместном культивировании в течение 24 часов с клетками THP-1, ACHN, 786-О или K562 в соотношении 3:1, 1:1 или 1:3. Измеряли IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  и GM-CSF.

[400] **На Фиг. 57** представлена серия графиков, показывающих экспансию Т-клеток от трех доноров, трансдуцированных TFP к CD 70, содержащих связывающие компоненты scFv или гуманизированные VHH, или TFP 70-001 к CD70 (P3E8), TFP C10, или нетрансдуцированных контролей.

[401] **На Фиг. 58** представлена серия графиков, показывающих эффективность трансдукции, определенную путем обнаружения экспрессии VHH в Т-клетках от одного репрезентативного донора, трансдуцированного TFP к CD70, имеющими показанные связывающие компоненты гуманизированные VHH, TFP 70-001 к CD70 (P3E8), или нетрансдуцированных контролей.

[402] **На Фиг. 59** представлена серия графиков, показывающих данные проточной цитометрии, которые отражают CD4+ и CD8+ положительность в Т-клетках от одного репрезентативного донора, трансдуцированного TFP к CD70, имеющими показанные связывающие компоненты гуманизированные VHH, TFP 70-001 к CD70 (P3E8), или нетрансдуцированных контролей.

[403] **На Фиг. 60А-60С** представлена серия графиков, показывающих фенотип памяти, определенный с помощью проточной цитометрии, которая позволяет определить экспрессию CD45RA и CD27 на клеточной поверхности в Т-клетках от одного репрезентативного донора, трансдуцированного TFP к CD70, имеющими показанные связывающие компоненты гуманизированного VHH, TFP 70-001 к CD70 (P3E8), нетрансдуцированных контролей. **На Фиг. 60А** показано общее количество CD3+ Т-клеток. **На Фиг. 60В** показаны CD4+ Т-клетки. **На Фиг. 60С** показаны CD8+ Т-клетки.

[404] **На Фиг. 61** представлена серия графиков, показывающих цитотоксичность Т-клеток, трансдуцированных TFP, имеющими показанные связывающие компоненты, полученных в присутствии или в отсутствие антитела 41D12, как указано, или нетрансдуцированных контрольных Т-клеток от одного репрезентативного донора при совместном культивировании в течение 24 часов с клетками THP-1, ACHN, 786-О, MOLM14 или K562 в соотношении 3:1, 1:1 или 1:3.

[405] **На Фиг. 62А-62D** представлена серия графиков, показывающих продукцию цитокинов Т-клетками, трансдуцированными TFP, имеющими показанные связывающие компоненты, которые получены в присутствии или в отсутствие антитела 41D12, как указано, или нетрансдуцированными контрольными Т-клетками от одного репрезентативного донора при совместном культивировании в течение 24 часов с клетками THP-1, ACHN, 786-О, MOLM13 или K562 в соотношении 3:1, 1:1 или 1:3. Измеряли IFN- $\gamma$  (**Фиг. 62А**), GM-CSF (**Фиг. 62В**), IL-2 (**Фиг. 62С**) и TNF- $\alpha$  (**Фиг. 62D**).

[406] **На Фиг. 63** представлен график, показывающий экспансию Т-клеток, трансдуцированных TFP к CD 70 С10 с или без слитого белка PD-1-CD28 или связанного с мембраной IL-15, или нетрансдуцированных контролей.

[407] **На Фиг. 64** представлена серия графиков, показывающих эффективность трансдукции (определяемую путем обнаружения экспрессии VHN), экспрессию PD-1 на клеточной поверхности и экспрессию IL15R $\alpha$  на клеточной поверхности Т-клеток, трансдуцированных TFP к CD70 С10 с или без слитого белка PD-1-CD28 или связанного с мембраной IL-15, или нетрансдуцированных контролей.

[408] **На Фиг. 65** представлена серия графиков, показывающих данные проточной цитометрии, которые отражают CD4<sup>+</sup> положительность в Т-клетках, трансдуцированных TFP к CD70 С10 с или без слитого белка PD-1-CD28 или связанного с мембраной IL-15, или нетрансдуцированных контролей.

[409] **На Фиг. 66** представлена серия графиков, показывающих фенотип памяти, определенный с помощью проточной цитометрии, которая позволяет определить экспрессию CD45RA и CD27 на клеточной поверхности в Т-клетках, трансдуцированных TFP к CD70 С10 с или без слитого белка PD-1-CD28 или связанного с мембраной IL-15, или нетрансдуцированных контролей.

[410] **На Фиг. 67** представлена серия графиков, показывающих экспансию Т-клеток от двух доноров, трансдуцированных TFP к CD70, имеющими показанными связывающими компонентами scFv человека, или нетрансдуцированных контролей.

[411] **На Фиг. 68А и 68В** представлена серия графиков, показывающих CD8-положительность и эффективность трансдукции, как определено путем обнаружения экспрессии scFv в Т-клетках от двух репрезентативных доноров, трансдуцированных TFP к CD70, имеющих показанные связывающие компоненты scFv человека, или нетрансдуцированных контролей. **На Фиг. 68А** показаны Т-клетки от донора R017, а на **Фиг. 68В** показаны Т-клетки от донора R022.

[412] **На Фиг. 69А и 69В** представлена серия графиков, демонстрирующих данные проточной цитометрии, которые отражают экспрессию CD70 на клеточной поверхности в Т-клетках от двух доноров, трансдуцированных TFP к CD70, имеющих показанные связывающие компоненты scFv человека, или нетрансдуцированных контролей. **На Фиг. 69А** показаны Т-клетки от донора R017, а на **Фиг. 69В** показаны Т-клетки от донора R022.

[413] **На Фиг. 70А-70D** представлена серия графиков, показывающих фенотип памяти, определенный с помощью проточной цитометрии, которая позволяет определить экспрессию CD45RA и CD27 на клеточной поверхности в Т-клетках от двух доноров, трансдуцированных TFP к CD70, имеющих показанные связывающие компоненты scFv человека, или нетрансдуцированных контролей. **На Фиг. 70А** показаны CD8<sup>+</sup> Т-клетки от донора R017. **На Фиг. 70В** показаны CD4<sup>+</sup> Т-клетки от донора R017. **На Фиг. 70С** показаны CD8<sup>+</sup> Т-клетки от донора R022. **На Фиг. 70D** показаны CD4<sup>+</sup> Т-клетки от донора R022.

[414] **На Фиг. 71А и 71В** представлена серия графиков, показывающих

цитотоксичность Т-клеток от двух доноров, трансдуцированных TFP, имеющими показанные связывающие компоненты, или нетрансдуцированных контрольных Т-клеток при совместном культивировании в течение 24 часов с клетками THP-1, ACHN, 786-О или K562 в соотношении 3:1, 1:1 или 1:3. **На Фиг. 71А** показаны Т-клетки от донора R017, а на **Фиг. 71В** показаны Т-клетки от донора R022.

[415] **На Фиг. 72А и 72В** представлена серия графиков, показывающих объем опухоли у мышей, получавших лечение CD70.TFP+ Т-клетками, полученными в соответствии со способами, описанными в Примере 21, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70 в мышинной модели почечно-клеточной карциномы. **На Фиг. 72А** показан объем опухоли после начального лечения, а на **Фиг. 72В** показан объем опухоли после повторного заражения.

[416] **На Фиг. 73А-73С** показан рост опухоли у мышей, получавших лечение CD70.TFP+ Т-клетками, полученными в соответствии со способами, описанными в Примере 21, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70 в мышинной модели системной лимфомы Беркитта человека. Рост опухоли определяли по люминесценции. **На Фиг. 73А** показан график роста опухоли во всех группах на одном графике. **На Фиг. 73В** показаны отдельные графики для каждой группы. **На Фиг. 73С** показаны изображения люминесценции для каждого субъекта.

[417] **На Фиг. 74А и 74В** показан рост опухоли у мышей, получавших лечение CD70.TFP+ Т-клетками, полученными в соответствии со способами, описанными в Примере 21, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70 в мышинной модели системного миелоидного лейкоза человека. Рост опухоли определяют по люминесценции. **На Фиг. 74А** показан график роста опухоли во всех группах на одном графике. **На Фиг. 74В** показаны отдельные графики для каждой группы при дозе  $1e7$  TFP+ Т-клеток.

[418] **На Фиг. 75** представлен график, показывающий объем опухоли у мышей, получавших лечение CD70.TFP+ Т-клетками, полученными в соответствии со способами, описанными в Примере 21, в присутствии и в отсутствие антитела к CD70 в мышинной модели почечно-клеточной карциномы (ACHN).

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[419] Настоящее изобретение относится к молекуле рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), где TFP содержит: (a) субъединицу TCR, содержащую: (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR и (ii) трансмембранный домен TCR, (iii) внутриклеточный домен TCR и (b) антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD70; и где субъединица TCR и антигенсвязывающий домен функционально связаны, или вектор содержит рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты. Также в данном документе описана молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность, кодирующую антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с CD70. Также в данном документе описана клетка, например, Т-клетка, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность,

кодирующую TFP, как описано в данном документе. Клетка может дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, содержащую первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы (например, PD-1), связанную со вторым полипептидом, содержащим положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена (например, костимулирующий домен и первичный сигнальный домен), и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент, субъединицу рецептора IL-15 (IL-15R) или ее фрагмент, или их комбинацию. Также в данном документе описаны фармацевтическая композиция, содержащая клетку, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, способы лечения злокачественного новообразования у субъекта путем введения субъекту фармацевтической композиции, как описано в данном документе, и способы получения клетки, как описано в данном документе.

#### Определения

[420] Если не указано иное, все термины в данной области техники, обозначения и другие научные термины или терминология, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены в данном документе для ясности и/или для удобства ссылки, и включение таких определений в данный документ не обязательно должно толковаться как представляющее отличие от того, что обычно учитывается в данной области техники. Способы и процедуры, описанные или на которые в данном документе делается ссылка, как правило, являются хорошо понятными и обычно используются специалистами в данной области техники с использованием общепринятых методологий, таких как, например, широко используемые методологии молекулярного клонирования, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th ed. (2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. В зависимости от конкретного случая процедуры, включающие использование имеющихся в продаже наборов и реагентов в целом проводятся в соответствии с протоколами и/или состояниями, определенными производителем, если не указано иное.

[421] В контексте данного документа формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если из контекста явно следует иное. Термины «включать», «такой как» и т.п. предназначены для обозначения включения без ограничения, если специально не указано иное.

[422] Используемый в данном документе термин «содержать» или его вариации, такие как «содержит» или «содержащий», следует понимать как указание на включение любого приведенного целого числа (например, признака, элемента, характеристики, свойства, стадии способа/процесса или ограничения) или группу целых чисел (например, признаков, элементов, характеристик, свойств, стадии способа/процесса или ограничений), но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел. Таким образом, используемый в данном документе термин «содержащий» является

включающим и не исключает дополнительных, неуказанных целых чисел или стадий способа/процесса.

[423] В вариантах осуществления любых композиций и способов, представленных в данном документе, «содержащий» может быть заменен на «состоящий по существу из» или «состоящий из». Фраза «состоящий по существу из» используется в данном документе для того, чтобы указать определенное целое(-ые) или стадии, а также те, которые не оказывают существенного влияния на характер или функцию заявленного изобретения. Используемый в данном документе термин «состоящий» используется для обозначения присутствия указанного целого числа (например, признака, элемента, характеристики, свойства, стадии способа/процесса или ограничения) или группы целых чисел (например, признаков, элементов, характеристик, свойств, стадий способа/процесса или ограничений).

[424] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается обычным специалистом в области техники, к которой относится изобретение.

[425] Термин «около» указывает и охватывает указанное значение и диапазон выше и ниже этого значения. В некоторых вариантах осуществления термин «около» означает указанное значение  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$  или  $\pm 1\%$ . В определенных вариантах осуществления, где это применимо, термин «около» указывает обозначенное значение (значения)  $\pm$  одно стандартное отклонение этого значения (значений).

[426] Как используется в данном документе, термин «антитело» относится к белковым или полипептидным последовательностям, полученным из молекулы иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины поликлонального или моноклонального происхождения или их фрагменты и могут быть получены из естественных или рекомбинантных источников.

[427] Термин «антигенсвязывающий домен» означает часть антитела, которая способна специфически связываться с антигеном или эпитопом. Одним из примеров антигенсвязывающего домена представляет собой антигенсвязывающий домен, образованный димером  $V_H-V_L$  антитела. Другим примером антигенсвязывающего домена является антигенсвязывающий домен, образованный диверсификацией определенных петель из десятого домена фибронектина типа III аднектина.

[428] Термины «фрагмент антитела» или «связывающий домен антитела» относятся к по меньшей мере одной части антитела или ее рекомбинантным вариантам, которые содержат антигенсвязывающий домен, т. е. определяющую антигенность переменную область интактного антитела, которых будет достаточно для обеспечения распознавания и специфического связывания фрагмента антитела с мишенью, такой как антиген и его определенный эпитоп. К примерам фрагментов антител относятся, помимо прочего, фрагменты Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- и Fv, одноцепочечные (sc) Fv-фрагменты антител («scFv»), линейные антитела, однодоменные антитела (сокращенно «sdAb») ( $V_L$  либо  $V_H$ ),

верблужьи домены  $V_{\text{H}}$  и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[429] Термин «scFv» относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, причем переменные области легкой и тяжелой цепи непрерывно соединены посредством короткого гибкого полипептидного линкера и способны быть экспрессированы как одна полипептидная цепь, и причем scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он был получен.

[430] «Переменная область тяжелой цепи» или « $V_{\text{H}}$ » (или в случае однодоменных антител, например, наноантител, - « $V_{\text{H}}$ ») в отношении антитела относится к фрагменту тяжелой цепи, который содержит три CDR, перемежающих фланкирующие участки, известные как каркасные области, эти каркасные области, как правило, более высоко консервативны, чем CDR, и образуют каркас для поддержки CDR.

[431] Как используется в данном документе, если не указано иное, scFv может иметь переменные области  $V_{\text{L}}$  и  $V_{\text{H}}$  в любом порядке, например, по отношению к N-терминальным или C-терминальным концам полипептида scFv может содержать  $V_{\text{L}}$ -линкер- $V_{\text{H}}$  или  $V_{\text{H}}$ -линкер- $V_{\text{L}}$ .

[432] Часть композиции TFP по изобретению, содержащая антитело или его фрагмент антитела, может существовать в различных формах, в которых антигенсвязывающий домен экспрессируется как часть непрерывной полипептидной цепи, включая, например, однодоменный фрагмент антитела (sdAb) или антитела, содержащие только тяжелые цепи, HcAb, одноцепочечное антитело (scFv), полученное из мышиного, гуманизированного или человеческого антитела (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). В одном аспекте антигенсвязывающий домен состава TFP по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте TFP содержит фрагмент антитела, который содержит scFv или sdAb.

[433] Термин «тяжелая цепь антитела» относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях, и которая обычно определяет класс, к которому принадлежит антитело.

[434] Термин «легкая цепь антитела» относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях. Легкие каппа («κ»)- и лямбда («λ»)-цепи относятся к двум основным изотипам легких цепей антитела.

[435] Термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое получают с применением технологии рекомбинантной ДНК, такому как, например, антитело,

экспрессируемое бактериофагом или системой дрожжей экспрессии. Термин также следует воспринимать как обозначающий антитело, которое было получено путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и которая экспрессирует белок антитела, или аминокислотной последовательности, определяющей антитело, причем ДНК или аминокислотная последовательность были получены с применением технологии рекомбинантной ДНК или аминокислотной последовательности, которая является доступной и хорошо известной в данной области техники.

[436] Термин «антиген» или «Аг» относится к молекуле, которая способна специфически связываться антителом или которая провоцирует иммунный ответ каким-либо другим образом. Такой иммунный ответ может предполагать или выработку антител, или активацию специфичных иммунокомпетентных клеток, или и то, и другое.

[437] Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Более того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или часть нуклеотидной последовательности, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, таким образом кодирует «антиген» в том значении, в котором этот термин используется в данном документе. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген не обязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно, что настоящее изобретение включает, помимо прочего, использование частей нуклеотидных последовательностей более одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности располагаются в различных комбинациях для того, чтобы кодировать полипептиды, которые вызывают желаемый иммунный ответ. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген совсем не обязательно должен кодироваться «геном». Очевидно, что антиген может быть образован путем синтеза, или может быть получен из биологического образца или может представлять собой макромолекулу, помимо полипептида. Подобный биологический образец может включать, помимо прочего, образец тканей, образец опухоли, клетку или жидкость с другими биологическими компонентами.

[438] «CD70» представляет собой цитокин, принадлежащий к семейству лигандов фактора некроза опухоли (TNF). Этот цитокин является лигандом для TNFRSF27/CD27. Это поверхностный антиген на активированных, но не покоящихся Т- и В-лимфоцитах. CD70 индуцирует пролиферацию костимулированных Т-клеток, усиливает образование цитолитических Т-клеток и способствует активации Т-клеток. Также отмечается, что CD70 играет роль в регуляции активации В-клеток, цитотоксической функции естественных клеток-киллеров и синтезе иммуноглобулинов.

[439] «Трансактиватор главного комплекса гистосовместимости класса II» или «СПТА» кодирует белок с кислым доменом активации транскрипции, 4 LRR (богатыми лейцином повторами) и GTP-связывающим доменом. Белок расположен в ядре и

действует как положительный регулятор транскрипции генов главного комплекса гистосовместимости класса II и упоминается как «главный фактор контроля» для экспрессии этих генов. Белок также связывает GTP и использует связывание GTP для облегчения своего транспорта в ядро. Попадая в ядро, он не связывает ДНК, а использует присущую ему ацетилтрансферазную (АТ) активность, чтобы действовать подобно коактиватору.

[440] Термин «противоопухолевый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, помимо прочего, например, уменьшение объема опухоли, уменьшение количества опухолевых клеток, уменьшение количества метастаз, увеличение вероятной продолжительности жизни, снижение пролиферации опухолевых клеток, снижение выживаемости опухолевых клеток или облегчение различных физиологических симптомов, связанных с раковым состоянием. «Противоопухолевый эффект» также может проявляться в способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по настоящему изобретению в первую очередь предотвращать появление опухоли.

[441] «Гуманизированные» формы не относящихся к человеку видов антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, не принадлежащего к человеческому роду. Гуманизированное антитело обычно представляет собой антитело человека (реципиентное антитело), в котором остатки из одной или более CDR заменены остатками из одной или более CDR нечеловеческого антитела (донорское антитело). Донорским антителом может быть любое подходящее нечеловеческое антитело, такое как мышье, крысиное, кроличье, куриное или нечеловеческое антитело приматов, имеющее желаемую специфичность, аффинность или биологический эффект. В некоторых случаях выбранные остатки каркасной области антитела-реципиента заменяются соответствующими остатками каркасной области донорского антитела. Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, которых нет ни в антителе реципиента, ни в антителе донора. Такие модификации могут быть сделаны для дальнейшего уточнения функции антитела. Для получения дополнительной информации, см., Jones et al., *Nature*, 1986, 321:522-525; Riechmann et al., *Nature*, 1988, 332:323-329; и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, 2:593-596, каждый из которых включен в полном объеме посредством ссылки.

[442] «Антитело человека» представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, соответствующей аминокислотной последовательности антитела, продуцируемого человеком или клеткой человека, или полученного из нечеловеческого источника, который использует репертуар человеческих антител или последовательности, кодирующие антитела человека (например, получены из человеческих источников или созданы *de novo*). Антитела человека конкретно исключают гуманизированные антитела.

[443] «Аффинность» относится к силе суммарного количества нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом) и ее

связывающим партнером (например, антигеном или эпитопом). Если не указано иное, в контексте данного документа «аффинность» относится к действительной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие в соотношении 1:1 между членами связывающей пары (например, антителом и антигеном или эпитопом). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y может быть представлена константой диссоциации ( $K_D$ ). Кинетические компоненты, которые вносят вклад в константу равновесия диссоциации, более подробно описаны ниже. Аффинность можно измерить обычными методами, известными в данной области техники, в том числе описанными в данном документе, такими как технология поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (например, BIACORE®) или биослойная интерферометрия (например, FORTEBIO®).

[444] Что касается связывания антитела или его фрагмент с молекулой-мишенью, термины «связывает», «специфическое связывание», «специфически связывается с», «специфично для», «селективно связывается» и «селективно в отношении» конкретного антигена (например, полипептид-мишень) или эпитоп на конкретном антигене означает связывание, которое заметно отличается от неспецифического или неселективного взаимодействия (например, с молекулой, не являющейся мишенью). Специфическое связывание можно измерить, например, путем измерения связывания с молекулой-мишенью и сравнения его со связыванием с молекулой, не являющейся мишенью. Специфическое связывание также может быть определено путем конкуренции с контрольной молекулой, которая имитирует эпитоп, распознаваемый на молекуле-мишени. В этом случае специфическое связывание указывается, если связывание антитела с молекулой-мишенью конкурентно ингибируется контрольной молекулой.

[445] Термин «аутологический» относится к любому материалу, полученному от того же индивида, которому впоследствии он будет вводиться.

[446] Термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида или другого пациента, отличных от того индивида, которому будет вводиться материал. Считается, что два или более индивидов являются аллогенными по отношению друг к другу, когда гены в одном или более локусов не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенный материал, полученный от индивидов одного и того же вида, может достаточно отличаться генетически для антигенного взаимодействия.

[447] Термин «ксеногенный» относится к трансплантату, полученному от животного другого вида.

[448] Термин «лечение» (и его вариации, такие как «лечить» или «процесс лечения») относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение заболевания или патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом. Лечение может проводиться как с профилактической целью, так и при течении клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение

метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение болезненного состояния, а также ремиссию или улучшение прогноза.

[449] Как используется в данном документе, «терапевтически эффективное количество» представляет собой такое количество композиции или ее активного компонента, которого будет достаточно для обеспечения положительного эффекта или для сокращения любым другим образом пагубного влияния на индивида, которому вводят эту композицию. Под термином «терапевтически эффективная доза» в данном документе понимают дозу, которая обеспечивает один или более желаемых или предпочтительных (например, положительных) эффектов, для достижения которых ее вводят, при этом подобное введение происходит один или более раз в течение заданного периода времени. Точная доза будет зависеть от цели лечения и устанавливаться специалистом в данной области техники с использованием известных методик (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); и Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

[450] Как используется в данном документе, «слитый белок Т-клеточного рецептора (TCR)» или «TFP» включает рекомбинантный полипептид, полученный из различных полипептидов, содержащих TCR, который, как правило, способен i) связываться с поверхностным антигеном на клетках-мишенях и ii) взаимодействовать с другими полипептидными компонентами интактного комплекса TCR, как правило, при совместном размещении в Т-клетке или на ее поверхности. «TFP-Т-клетка» представляет собой Т-клетку, которая была трансдуцирована в соответствии со способами, описанными в данном документе, и которая экспрессирует TFP, например, включенный в естественный TCR. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или CD4+/CD8+ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления TFP-Т-клетка представляет собой НК-клетку или регуляторную Т-клетку.

[451] Используемые в данном документе термины «Т-клеточный рецептор» и «комплекс Т-клеточного рецептора» используются взаимозаменяемо для обозначения молекулы, обнаруженной на поверхности Т-клеток, которая, как правило, отвечает за распознавание антигенов. TCR содержит гетеродимер, состоящий из альфа- и бета-цепей TCR, в 95% Т-клеток, тогда как 5% Т-клеток имеют TCR, состоящие из гамма- и дельта-цепей TCR. TCR дополнительно содержит один или более из CD3ε, CD3γ и CD3δ. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит CD3ε. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит CD3γ. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит CD3δ. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит CD3ζ. Взаимодействие TCR с антигеном, например, с антигеном и МНС, приводит к активации его Т-клеток посредством ряда биохимических событий, опосредованных ассоциированными ферментами, корецепторами и специализированными вспомогательными молекулами. В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-альфа человека имеет последовательность SEQ ID NO: 711. В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-альфа человека имеет домен IgC,

имеющий последовательность SEQ ID NO: 712, трансмембранный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 713, и внутриклеточный домен, имеющий последовательность SS. В некоторых вариантах константный домен мышинового TCR-альфа имеет последовательность SEQ ID NO:1267. В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-бета человека имеет последовательность SEQ ID NO: 715. В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-бета человека имеет домен IgC, имеющий последовательность SEQ ID NO: 716, трансмембранный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 717, и внутриклеточный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 719. В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-бета мыши имеет последовательность SEQ ID NO:1268. В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-дельта имеет последовательность SEQ ID NO: 725. В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-дельта содержит домен IgC, имеющий последовательность SEQ ID NO: 726, трансмембранный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 727, и внутриклеточный домен, имеющий последовательность L. В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-гамма имеет последовательность SEQ ID NO: 721. В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-гамма имеет домен IgC, имеющий последовательность SEQ ID NO: 722, трансмембранный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 723, и внутриклеточный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 724. В некоторых вариантах осуществления CD3-эпсилон имеет последовательность SEQ ID NO: 694. В некоторых вариантах осуществления CD3-эпсилон имеет внеклеточный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 696, трансмембранный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 697, и внутриклеточный домен, например, внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 698. В некоторых вариантах осуществления CD3-дельта имеет последовательность SEQ ID NO: 704. В некоторых вариантах осуществления CD3-дельта имеет внеклеточный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 706, трансмембранный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 707, и внутриклеточный домен, например, внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 708. В некоторых вариантах осуществления CD3-гамма имеет последовательность SEQ ID NO: 699. В некоторых вариантах осуществления CD3-гамма имеет внеклеточный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 701, трансмембранный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 702, и внутриклеточный домен, например, внутриклеточный сигнальный домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 703.

[452] Используемый в данном документе термин «субъект» означает субъекта-млекопитающее. Примеры субъектов включают людей, обезьян, собак, кошек, мышей, крыс, коров, лошадей, верблюдов, коз, кроликов, и овец. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой человека. «Пациент» представляет собой субъекта, страдающего или подверженного риску развития заболевания, нарушения или

патологического состояния, или иным образом нуждающегося в композициях и способах, представленных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется злокачественное новообразование, например, злокачественное новообразование, описанное в данном документе.

[453] Используемый в данном документе, термин «предотвращение» относится к предотвращению заболевания или патологического состояния, например, образования опухоли, у пациента. Например, если индивид, подверженный риску развития опухоли или другой формы злокачественного новообразования, получает лечение способами по настоящему изобретению, и у него впоследствии не будет развиваться опухоль или другая форма злокачественного новообразования, в таком случае у этого индивида заболевание будет предотвращено, по крайней мере в течение определенного периода времени.

[454] Термин «листок-вкладыш» используется для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических или диагностических продуктов (например наборы), которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно использования таких терапевтических или диагностических продуктов.

[455] Используемый в данном документе термин «цитотоксический агент» относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает клеточную функцию и/или вызывает гибель или нарушение клеток.

[456] «Химиотерапевтический агент» относится к химическому соединению, используемому при лечении злокачественного новообразования. Химиотерапевтические агенты включают «антигормональные агенты» или «эндокринные терапевтические агенты», которые действуют, регулируя, уменьшая, блокируя или подавляя эффекты гормонов, которые могут способствовать росту злокачественного новообразования.

[457] Термин «опухоль» относится ко всем видам роста и пролиферации опухолевых клеток, будь то злокачественные или доброкачественные, и всем предраковым и раковым клеткам и тканям. Термины «злокачественное новообразование», «злокачественный», «нарушение пролиферации клеток», «пролиферативное расстройство» и «опухоль» не исключают друг друга, как упоминается в данном документе. Термины «нарушение пролиферации клеток» и «пролиферативное нарушение» относятся к нарушениям, которые связаны с некоторой степенью аномальной пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления нарушение пролиферации клеток представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых аспектах опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых аспектах опухоль является гематологической злокачественной опухолью.

[458] Термин «злокачественное новообразование» относится к заболеванию, которое характеризуется быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных злокачественных новообразований

описаны в данном документе, к ним относится, помимо прочего, рак молочных желез, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легкого и т. п.

[459] Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы позволить биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента быть эффективной при лечении субъекта, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта в организме в количестве, предусмотренном в фармацевтической композиции.

[460] Термины «модулировать» и «модуляция» относятся к снижению или ингибированию или, альтернативно, активации или увеличению указанной переменной.

[461] Термины «увеличить» и «активировать» относятся к увеличению на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз или на большее значение в указанной переменной.

[462] Термины «уменьшить» и «ингибировать» относятся к уменьшению на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз или на большее значение в указанной переменной.

[463] Термин «агонизировать» относится к активации передачи сигналов рецептора, для вызова биологического ответа, связанного с активацией рецептора. «Агонист» представляет собой объект, который связывается с рецептором и агонирует с ним.

[464] Термин «антагонизировать» относится к ингибированию передачи сигналов рецептора для подавления биологической реакции, связанной с активацией рецептора. «Антагонист» представляет собой объект, который связывается с рецептором и антагонизирует с ним.

[465] Термин «эффекторная Т-клетка» включает Т-хелперы (т.е. CD4+) и цитотоксические (т.е. CD8+) Т-клетки. Эффекторные CD4+ Т-клетки способствуют развитию нескольких иммунологических процессов, включая созревание В-клеток в плазматические клетки и В-клетки памяти, а также активацию цитотоксических Т-клеток и макрофагов. Эффекторные CD8+ Т-клетки разрушают инфицированные вирусом клетки и опухолевые клетки. См. Seder and Ahmed, *Nature Immunol.*, 2003, 4:835-842, полностью включенную посредством ссылки, для получения дополнительной информации об эффекторных Т-клетках.

[466] Термин «регуляторные Т-клетки» включает клетки, которые регулируют иммунологическую толерантность, например, путем подавления эффекторных Т-клеток. В некоторых аспектах регуляторная Т-клетка имеет фенотип CD4+CD25+Foxp3+. В некоторых аспектах регуляторная Т-клетка имеет фенотип CD8+CD25+. См. Nocentini et al., *Br. J. Pharmacol.*, 2012, 165:2089-2099, полностью включенная посредством ссылки, для получения дополнительной информации о регуляторных Т-клетках, экспрессирующих CD70.

[467] Термин «дендритная клетка» относится к профессиональной антигенпрезентирующей клетке, способной активировать наивную Т-клетку и стимулировать рост и дифференцировку В-клетки.

[468] Фраза «заболевание, ассоциированное с экспрессией CD70» включает, но не ограничивается этим, заболевание, ассоциированное с экспрессией CD70, или патологическое состояние, ассоциированное с клетками, экспрессирующими CD70, включая, например, пролиферативные заболевания, такие как злокачественная опухоль, злокачественное новообразование или предраковое состояние. В одном аспекте заболевание представляет собой злокачественное новообразование.

[469] В некоторых случаях злокачественное новообразование представляет собой Т-клеточную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), мантийно-клеточную лимфому (MCL), острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), вирус Эпштейна-Барр (EBV) + злокачественное новообразование или вирус папилломы человека (HPV) + злокачественное новообразование. В некоторых случаях злокачественное новообразование представляет собой рак почки, почечно-клеточный рак, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак пищевода, рак носоглотки, мезотелиому, глиобластому, рак тимуса, рак молочной железы, рак головы и шеи или рак желудка.

[470] В некоторых случаях злокачественное новообразование может представлять собой острый лимфоцитарный рак, острый миелоидный лейкоз, альвеолярную рабдомиосаркому, рак мочевого пузыря (например, карциному мочевого пузыря), рак кости, рак головного мозга (например, медуллобластому), рак молочной железы, рак ануса, анального канала, или аноректума, рак глаза, рак внутрипеченочных желчных протоков, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, носовой полости или среднего уха, рак ротовой полости, рак вульвы, хронический лимфолейкоз (CLL), хронический миелоидный лейкоз, рак толстой кишки, рак пищевода, рак шейки матки, фибросаркому, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), глиобластому, лимфому Ходжкина, рак гортаноглотки, рак почки, рак гортани, лейкоз, гемобластоз, рак печени, рак легкого (например, немелкоклеточную карциному легкого), лимфому, диффузную крупно-В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, злокачественную мезотелиому, мастоцитому, меланому, множественную миелому, рак носоглотки, неходжкинскую лимфому (NHL), В-хронический лимфолейкоз, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), лимфому Беркитта, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак брюшины, сальника, рак брыжейки, рак глотки, рак предстательной железы, RCC, ccRCC, рак прямой кишки, рак почки, рак кожи, рак тонкой кишки, рак мягких тканей, солидные опухоли, рак желудка, рак яичек, рак щитовидной железы или рак мочеочника.

[471] Термин «консервативные модификации в последовательностях» относится к аминокислотным модификациям, которые в значительной степени не влияют и не

изменяют характеристики связывания антитела или фрагмента антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, вставки и делеции. Модификации могут быть внесены в антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению с помощью стандартных способов, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены - это такие замены, в которых аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в пределах TFP по настоящему изобретению могут быть замещены другими аминокислотными остатками из одного и того же семейства боковых цепей, а измененный TFP может быть протестирован с помощью функциональных анализов, описанных в данном документе.

[472] Термин «стимуляция» относится к первичному ответу, индуцированному связыванием стимулирующего домена или стимулирующей молекулы (например, комплекс TCR/CD3) с их распознаваемым лигандом, опосредуя, таким образом, событие сигнальной трансдукции, такое как, помимо прочего, сигнальная трансдукция через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул и/или реорганизацию цитоскелетных структур и т. п.

[473] Термин «стимулирующая молекула» или «стимулирующий домен» относится к молекуле или ее части, экспрессируемой Т-клеткой, которая обеспечивает последовательности первичного цитоплазматического сигналинга, которые регулируют первичную активацию комплекса TCR стимулирующим путем для по меньшей мере некоторых аспектов сигнального пути Т-клетки. В одном аспекте первичный сигнал инициируется посредством, например, связывания комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, загруженной пептидом, что приводит к опосредованию Т-клеточного ответа, включая, помимо прочего, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т. п. Последовательность первичной цитоплазматической сигнализации (также называемая «первичный сигнальный домен»), которая действует стимулирующим путем, может содержать мотив сигналинга, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или «ИТАМ». К примерам последовательности первичного цитоплазматического сигналинга, содержащей ИТАМ, для конкретного применения в настоящем изобретении относятся, помимо прочего, производные от TCR-дзета, FcR-

гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известный как «ICOS») и CD66d.

[474] Термин «антигенпрезентирующая клетка» или «APC» относится к клетке иммунной системы, такой как вспомогательная клетка (например, В-клетка, дендритная клетка и т. п.), которая презентует чужеродный антиген, входящий в состав основных комплексов гистосовместимости (МНС), на ее поверхности. Т-клетки могут распознавать такие комплексы с помощью Т-клеточных рецепторов (TCR). APC обрабатывают антигены и представляют их Т-клеткам.

[475] Как используется в данном документе, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к внутриклеточной части молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который вызывает иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей TFP, например, TFP-экспрессирующей Т-клетки. К примерам иммунной эффекторной функции, например, в TFP-экспрессирующей Т-клетке, относится цитолитическая активность и активность Т-хелперов, включая секрецию цитокинов. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. К примерам первичных внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные от молекул, которые отвечают за первичную стимуляцию или стимуляцию, зависящую от антигена. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. К примерам костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные из молекул, которые отвечают за костимулирующие сигналы или стимуляцию, зависящую от антигена.

[476] Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать ITAM («иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив»). К примерам последовательностей первичного цитоплазматического сигналинга, содержащих ITAM, относятся, помимо прочего, производные CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b CD66d, DAP10 и DAP12.

[477] Термин «костимулирующая молекула» относится к когнатному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, опосредуя, таким образом, костимулирующий ответ Т-клетки, такой как, помимо прочего, пролиферация. Костимулирующие молекулы являются молекулами клеточной поверхности, отличными от рецепторов антигенов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие молекулы включают, помимо прочего, молекулу МНС класса 1, BTLA и Toll-подобный рецептор, а также DAP10, DAP12, CD30, LIGHT, OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) и 4-1BB (CD137). Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой внутриклеточную часть костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может быть представлена в следующих семействах белков: белки рецептора TNF, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы к цитокинам,

интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. К примерам подобных молекул относится CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-НЗ и лиганд, который специфически связывается с CD83 и т. п. Внутриклеточный сигнальный домен может содержать всю внутриклеточную часть или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он был получен, или его функциональный фрагмент. Термин «4-1BB» относится к члену суперсемейства TNFR с аминокислотной последовательностью, представленной под номером доступа GenBank AAA62478.2, или эквивалентным остаткам из видов, отличных от человека, например мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т.п.; а «костимулирующий домен 4-1BB» определяется как аминокислотные остатки 214-255 под номером доступа GenBank AAA62478.2, или эквивалентным остаткам видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п.

[478] Термин «кодирующий» относится к присущему свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих или определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК), или определенную последовательность аминокислот, а также к биологическим свойствам, полученным в результате этого. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодируют белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, вырабатывается белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно предоставляется в перечнях последовательностей, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут рассматриваться как кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК.

[479] Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза «нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК» также может включать интроны в той мере, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых версиях содержать один или более интронов.

[480] Термин «эндогенный» относится к любому материалу, полученному от организма, клетки, ткани или системы либо произведенному внутри них.

[481] Термин «экзогенный» относится к любому материалу, введенному из организма, клетки, ткани или системы либо произведенному за их пределами.

[482] Термин «экспрессия» относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности, управляемой промотором.

[483] Термин «функциональное нарушение» относится к физическому или биохимическому изменению конкретной (например, целевой) нуклеиновой кислоты (например, гена, транскрипта РНК или кодируемого ею белка), которое препятствует ее нормальной экспрессии и/или поведению в клетке. В одном варианте осуществления функциональное нарушение относится к модификации гена с помощью метода генного редактирования. В другом варианте функциональное нарушение предотвращает экспрессию гена-мишени (например, эндогенного гена).

[484] Термин «вектор переноса» относится к композиции вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которая может использоваться для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Многочисленные векторы известны в данной области техники, включая, помимо прочего, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин «вектор переноса» включает способную к автономной репликации плазмиду или вирус. Термин также следует воспринимать как такой, который дополнительно включает неплазмидные и невирусные соединения, которые способствуют переносу нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизиновое соединение, липосома и т. п. К примерам вирусных векторов переноса относятся, помимо прочего, аденовирусные векторы, векторы на основе адено-ассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т. п.

[485] Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, который содержит регулирующие экспрессию последовательности, функционально соединенные с нуклеотидной последовательностью, которая подлежит экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточно действующих в *цис*-положении элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть обеспечены клеткой-хозяином или в *in vitro* системе экспрессии. Векторы экспрессии включают все известные в данной области техники векторы, включая космиды, плазмиды (например, «голые» или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые содержат рекомбинантный полинуклеотид.

[486] Термин «лентивирус» относится к роду семейства *Retroviridae*. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов благодаря способности инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, таким образом, они являются одним из наиболее эффективных вариантов вектора доставки генов. ВИЧ, вирус иммунодефицита обезьян, вирус кошачьего иммунодефицита являются примерами лентивирусов.

[487] Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, полученному из по меньшей мере части лентивирусного генома, включая, в особенности, самоинактивирующийся лентивирусный вектор, как предлагается у Milone et al., *Mol. Ther.* 17(8): 1453-1464 (2009). К другим примерам лентивирусных векторов, которые могут использоваться в клинической практике, относится, помимо прочего, например,

технология доставки генов LENTIVECTOR™ от компании Oxford BioMedica, система векторов LENTIMAX™ от компании Lentigen Technology и т. п. Неклинические типы лентивирусных векторов также доступны и известны специалисту в данной области техники.

[488] Термин «кРНК» или «кольцевая РНК» относится к классу одноцепочечных РНК со смежной структурой, обладающих повышенной стабильностью и отсутствием концевых мотивов, необходимых для взаимодействия с различными клеточными белками. кРНК представляют собой 3-5' ковалентно замкнутые кольца РНК, и кРНК не имеют кэп-или поли(А)-хвостов. кРНК лишены свободных концов, необходимых для экзонуклеаза-опосредованной деградации, что делает их устойчивыми к нескольким механизмам обмена РНК и обеспечивает им более продолжительную продолжительность жизни по сравнению с их линейными аналогами мРНК. По этой причине циркуляризация может позволить стабилизировать мРНК, которые обычно страдают коротким периодом полужизни, и, следовательно, может повысить общую эффективность мРНК в различных применениях. кРНК образуются в процессе сплайсинга, а циркуляризация происходит с использованием обычных сайтов сплайсинга, в основном на границах аннотированных экзонов (Starke et al., 2015; Szabo et al., 2015). Для циркуляризации сайты сплайсинга используются в обратном порядке: расположенные по ходу транскрипции доноры сплайсинга «соединяются» с расположенными против хода транскрипции акцепторами сплайсинга (см. обзор Jeck and Sharpless, 2014; Barrett and Salzman, 2016; Szabo and Salzman, 2016; Holdt et al., 2018).

[489] До сих пор сообщалось о трех основных стратегиях циркуляризации РНК: химические методы с использованием бромистого циана или аналогичного конденсирующего агента, ферментативные методы с использованием РНК или ДНК-лигаз и рибозимные методы с использованием саморасщепляющихся интронов. В предпочтительных вариантах осуществления РНК-предшественник синтезируют с помощью прерванной транскрипции, а затем нагревают в присутствии ионов магния и GTP для ускорения циркуляризации. Полученная таким образом РНК может эффективно трансфицировать различные типы клеток. В одном аспекте матрица включает последовательности TFP, CAR и TCR или их комбинацию.

[490] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления используется рибозимный метод с использованием пермутированного каталитического интрона группы I. Этот метод более применим для циркуляризации длинных РНК и требует только добавления GTP и Mg<sup>2+</sup> в качестве кофакторов. Эта стратегия сплайсинга пермутированных интрон-экзонных последовательностей (PIE) состоит из слитых частичных экзонов, окруженных последовательностями половин интронов. In vitro эти конструкции подвергаются реакциям двойной переэтерификации, характерным для каталитических интронов группы I, но поскольку экзоны сливаются, они вырезаются в виде ковалентно связанных 5'- и 3'-связанных колец.

[491] Термин «гомологичный» или «идентичность» относится к идентичности

последовательности субъединицы между двумя полимерными молекулами, например, между двумя молекулами нуклеиновой кислоты, такими как две молекулы ДНК или две молекулы РНК, или между двумя полипептидными молекулами. Когда положение субъединицы в обеих молекулах занимает одна и та же мономерная субъединица, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занимает аденин, в таком случае они являются гомологичными или идентичными в этом положении. Гомология между двумя последовательностями прямо пропорциональна количеству совпадающих или гомологичных положений; например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять субъединиц) положений в двух последовательностях будет гомологичной, две последовательности являются на 50% гомологичными; если 90% положений (например, 9 из 10) будут совпадать или будут гомологичными, две последовательности являются на 90% гомологичными.

[492] Термин «выделенный» означает измененный или удаленный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом существе, не являются выделенными, однако эта же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в естественном состоянии, будут выделенными. Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в чужеродной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

[493] В контексте настоящего изобретения для часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот используются следующие сокращения. «А» относится к аденозину, «С» относится к цитозину, «G» относится к гуанозину, «Т» относится к тимидину, а «U» относится к уридину.

[494] Термин «функционально соединенный» или «транскрипционный контроль» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной нуклеотидной последовательностью, которая приводит к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты является функционально соединенной со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты попадает в функциональную взаимосвязь со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально соединенные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом и, например, если необходимо соединить две кодирующие белок области, находиться в одной и той же рамке считывания.

[495] Термин «парентеральное» введение иммуногенной композиции включает, например, подкожную (п/к), внутривенную (в/в), внутримышечную (в/м) или внутригрудинную инъекцию, внутритропухолевое введение или методы инфузии.

[496] Термин «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их

полимерам в одно- или двухцепочечной форме. При отсутствии специальных ограничений данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, обладающие свойствами связывания, аналогичными свойствам эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизирующиеся аналогично нуклеотидам природного происхождения. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно включает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также последовательность, указанную явно. Конкретно, замены вырожденных кодонов могут достигаться путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или большего числа выбранных (или всех) кодонов замещено на остатки смешанного основания и/или дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

[497] Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, содержащему аминокислотные остатки, ковалентно связанные пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не ограничивается максимальным количеством аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Как используется в данном документе, этот термин относится как к коротким цепям, которые в данной области техники также часто называются пептидами, олигопептидами и олигомерами, например, так и к более длинным цепям, которые в данной области техники обычно называются белками, которых существует множество типов. К «полипептидам» относятся, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитые белки, среди прочих. Полипептид включает природный пептид, рекомбинантный пептид или их комбинацию.

[498] Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, распознаваемой механизмом транскрипции клетки или введенным синтетическим механизмом, который может инициировать специфическую транскрипцию полинуклеотидной последовательности.

[499] Термин «промоторная/регуляторная последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которую можно использовать для экспрессии генного продукта, функционально связанного с промоторной/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может являться коровой промоторной последовательностью, а в других случаях эта последовательность может также включать энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые необходимы для экспрессии продукта гена. Промоторная/регуляторная последовательность может, например, быть такой, которая экспрессирует продукт гена

тканеспецифическим способом.

[500] Термин «конститутивный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально соединена с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает выработку продукта гена в клетке при большинстве или всех физиологических условиях клетки.

[501] Термин «индуцибельный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально соединена с полинуклеотидом, кодирующим или определяющим продукт гена, вызывает выработку продукта гена в клетке по существу только тогда, когда в клетке присутствует индуктор, который соответствует этому промотору.

[502] Термин «тканеспецифический» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально соединена с полинуклеотидом, кодирующим ген или определяющимся геном, вызывает выработку продукта гена в клетке по существу только в том случае, если клетка представляет собой клетку такого типа ткани, который соответствует промотору.

[503] Термины «линкер» и «гибкий полипептидный линкер», употребляемые в контексте scFv, относятся к пептидному линкеру, который состоит из аминокислот, таких как глициновые и/или сериновые остатки, используемые отдельно или в комбинации, для соединения вместе варибельного участка тяжелой цепи и варибельного участка легкой цепи. В одном варианте осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой линкер Gly/Ser и содержит аминокислотную последовательность (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>, где n представляет собой положительное целое число, равное или большее 1. Например, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5, n=6, n=7, n=8, n=9 и n=10. В одном варианте осуществления гибкий полипептидный линкер включает, помимо прочего, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub> или (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. В другом варианте осуществления линкеры включают множество повторов (Gly<sub>2</sub>Ser), (GlySer) или (Gly<sub>3</sub>Ser). В объем настоящего изобретения также включены линкеры, описанные в WO2012/138475 (включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых случаях линкерная последовательность содержит (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, где n=2-4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, где n=1-3.

[504] Как используется в данном документе, 5'-кэп (также называемый кэп РНК, кэп РНК 7-метилгуанозин или кэп РНК m7G) представляет собой модифицированный гуаниновый нуклеотид, который добавили в «переднюю часть» или к 5'-концу эукариотической матричной РНК вскоре после начала транскрипции. 5'-кэп состоит из концевой группы, которая связана с первым транскрибированным нуклеотидом. Его присутствие является критическим для распознавания рибосомой и защиты от РНКаз. Добавление кэпа связано с транскрипцией и происходит котранскрипционно таким образом, что одно влияет на другое. Вскоре после начала транскрипции 5'-конец синтезируемой мРНК связывается с синтезирующим кэп комплексом, связанным с РНК-полимеразой. Этот ферментный комплекс катализирует химические реакции, необходимые для кэпирования мРНК. Синтез протекает как многоступенчатая

биохимическая реакция. Кэпирующий фрагмент может быть модифицирован для модуляции функциональности мРНК, такой как ее стабильность или эффективность трансляции.

[505] Как используется в данном документе, термин «транскрибированная *in vitro* РНК» относится к РНК, предпочтительно мРНК, которая была синтезирована *in vitro*. В целом, транскрибированную *in vitro* РНК получают из *in vitro* транскрипционного вектора. *In vitro* транскрипционный вектор содержит матрицу, которая используется для получения транскрибированной *in vitro* РНК.

[506] Используемый в данном документе «поли(А)» представляет собой серию аденозинов, присоединенных путем полиаденилирования к мРНК. В предпочтительном варианте осуществления конструктор для временной экспрессии поли(А) находится между 50 и 5000, предпочтительно более чем 64, более предпочтительно более чем 100, наиболее предпочтительно более чем 300 или 400. Поли(А) последовательности можно модифицировать химически или ферментативно для модуляции функциональности мРНК, такой как локализация, стабильность или эффективность трансляции.

[507] Как используется в данном документе, термин «полиаденилирование» относится к ковалентной связи полиаденилового фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. У эукариот большинство молекул матричной РНК (мРНК) являются полиаденилированными на 3'-конце. 3'-поли(А)-хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (часто несколько сотен), добавленных к пре-мРНК посредством действия фермента полиаденилат-полимеразы. У высших эукариот поли(А)-хвост добавляется к транскриптам, которые содержат определенную последовательность, сигнал полиаденилирования. Поли(А)-хвост и связанный с ним белок помогают защитить мРНК от разрушения экзонуклеазами. Полиаденилирование также является важным для терминации транскрипции, экспорта мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование происходит в ядре непосредственно после транскрипции ДНК в РНК, однако может дополнительно происходить позже в цитоплазме. После окончания транскрипции цепь мРНК расщепляется действием комплекса эндонуклеазы, связанного с РНК-полимеразой. Участок расщепления, как правило, характеризуется присутствием последовательности оснований AAUAAA (SEQ ID NO: 689) возле участка расщепления. После расщепления мРНК аденозиновые остатки добавляют к свободному 3'-концу на участке расщепления.

[508] Как используется в данном документе, «транзистентный» относится к экспрессии неинтегрированного трансгена в течение периода времени, выраженного в часах, днях или неделях, причем период времени экспрессии меньше, чем период времени для экспрессии гена, интегрированного в геном или содержащегося в стабильном репликоне плазмиды в клетке-хозяине.

[509] Термин «путь сигнальной трансдукции» относится к биохимической взаимосвязи между различными молекулами сигнальной трансдукции, которые играют роль в передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. Фраза «рецептор

клеточной поверхности» включает молекулы и комплексы молекул, способные принимать сигнал и передавать его через мембрану клетки.

[510] Термин «по существу очищенная» клетка относится к клетке, которая практически не содержит другие типы клеток. По существу очищенная клетка также относится к клетке, которая была отделена от других типов клеток, с которыми она обычно связана в своем естественном состоянии. В некоторых случаях популяция по существу очищенных клеток относится к гомогенной популяции клеток. В других случаях этот термин относится просто к клеткам, которые были отделены от клеток, с которыми они естественным образом связаны в своем естественном состоянии. В некоторых аспектах эти клетки культивируются *in vitro*. В других аспектах эти клетки не культивируются *in vitro*.

[511] Как используется в данном документе, термин «терапевтический» означает лечение. Терапевтический эффект достигается путем уменьшения, подавления, ремиссии или устранения болезненного состояния.

[512] Как используется в данном документе, термин «профилактика» означает предотвращение заболевания или болезненного состояния либо их профилактическое лечение.

[513] В контексте настоящего изобретения «опухолевый антиген», или «антиген гиперпролиферативного заболевания», или «антиген, связанный с гиперпролиферативным заболеванием» относится к антигенам, которые характерны для конкретных гиперпролиферативных заболеваний. В определенных аспектах антигены гиперпролиферативного заболеваний по настоящему изобретению были получены из злокачественных новообразований, включая, но не ограничиваясь этим, первичную или метастатическую меланому, тимому, лимфому, саркому, мезотелиому, почечно-клеточную карциному, рак желудка, рак молочной железы, рак легкого, рак желудка, рак яичников, NHL, лейкозы, рак матки, рак предстательной железы, рак толстой кишки, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак почки, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак головного мозга, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак эндометрия и рак желудка.

[514] В некоторых случаях заболевание представляет собой злокачественное новообразование, выбранное из группы, состоящей из острого лимфоцитарного рака, острого миелоидного лейкоза, альвеолярной рабдомиосаркомы, рака мочевого пузыря (например, карциномы мочевого пузыря), рака кости, рака головного мозга (например, медуллобластомы), рака молочной железы, рака ануса, анального канала, или аноректума, рака глаза, рака внутривенных желчных протоков, рака суставов, рака шеи, желчного пузыря или плевры, рака носа, носовой полости или среднего уха, рака ротовой полости, рака вульвы, хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелоидного лейкоза, рака толстой кишки, рака пищевода, рака шейки матки, фибросаркомы, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта, рака головы и шеи (например, плоскоклеточного рака

головы и шеи), глиобластомы, лимфомы Ходжкина, рака гортаноглотки, рака почки, рака гортани, лейкоза, гемобластоза, рака печени, рака легкого (например, немелкоклеточной карциномы легкого), лимфомы, диффузной крупно-В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, злокачественной мезотелиомы, мастоцитомы, меланомы, множественной миеломы, рака носоглотки, неходжкинской лимфомы (NHL), В-хронического лимфолейкоза, волосатоклеточного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), лимфомы Беркитта, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака брюшины, сальника, рака брыжейки, рака глотки, рака предстательной железы, RCC, ccRCC, рака прямой кишки, рака почки, рака кожи, рака тонкой кишки, рака мягких тканей, солидных опухолей, рака желудка, рака яичек, рака щитовидной железы или рака мочеочника.

[515] В некоторых случаях заболевание представляет собой злокачественное новообразование, выбранное из группы, состоящей из Т-клеточной лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), мантийно-клеточной лимфомы (MCL), острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластического синдрома (MDS), вируса Эпштейна-Барра (EBV) + злокачественного новообразования или вируса папилломы человека (HPV) + злокачественного новообразования. В некоторых случаях злокачественное новообразование представляет собой рак почки, почечно-клеточный рак, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак пищевода, рак носоглотки, мезотелиому, глиобластому, рак тимуса, рак молочной железы, рак головы и шеи или рак желудка

[516] Термин «трансфицированный», или «трансформированный», или «трансдуцированный» относится к процессу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. «Трансфицированная», или «трансформированная», или «трансдуцированная» клетка представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована с помощью экзогенной нуклеиновой кислоты. Клетка включает первичную клетку субъекта и свое потомство.

[517] Термин «специфически связывается» относится к антителу, фрагменту антитела или конкретному лиганду, который распознает и связывается с распознаваемым партнером по связыванию (например, CD70), присутствующим в образце, однако который не будет обязательно и по существу распознавать и связываться с другими молекулами в этом образце.

[518] Диапазоны: по всему тексту этого описания различные аспекты настоящего изобретения могут быть представлены в виде диапазонов. Следует понимать, что описание в виде диапазонов предоставляется исключительно для удобства и краткости, и его не следует воспринимать как негибкое ограничение объема настоящего изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в этом диапазоне. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует считать таким, которое

конкретно раскрывает поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. п.; а также отдельные числа в пределах этого диапазона, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. В качестве другого примера, диапазон, такой как 95-99% идентичности, включает что-либо с 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности, а также включает такие поддиапазоны, как 96-99%, 96-98%, 96- 97%, 97-99%, 97-98% и 98-99% идентичности. Это применяется независимо от ширины диапазона.

[519] «Белок программируемой гибели клеток 1», также известный как PD-1, CD279 (кластер дифференцировки 279), PDCD1, PD1, SLEB2, hPD-1, hSLE1 и белок запрограммированной клеточной гибели 1, относится к белку на поверхности клеток, который играет роль в регулировании реакции иммунной системы на клетки человеческого организма путем подавления иммунной системы и повышения ауто толерантности путем подавления воспалительной активности Т-клеток. Это предотвращает аутоиммунные заболевания, но также может помешать иммунной системе убивать раковые клетки. PD-1 представляет собой иммунную контрольную точку и защищает от аутоиммунных реакций, например, с помощью двух механизмов. Во-первых, он способствует апоптозу (белок программируемой гибели клеток) антигенспецифических Т-клеток в лимфатических узлах. Во-вторых, он уменьшает апоптоз в регуляторных Т-клетках (противовоспалительных, супрессорных Т-клетках). PD-1 представляет собой рецептор клеточной поверхности, который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов и экспрессируется на Т-клетках и про-В-клетках. PD-1 связывает два лиганда, PD-L1 и PD-L2. PD-1, используемый в данном документе, включает любые рекомбинантные или встречающиеся в природе формы PD-1 или их варианты или гомологи, которые обладают или сохраняют активность PD-1 (например, по меньшей мере 40% 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности). В некоторых аспектах варианты или гомологи имеют по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению с встречающимся в природе PD-1. В некоторых вариантах осуществления PD-1 по существу идентичен белку, идентифицированному под каталожным номером UniProt Q15116, или варианту или гомологу, имеющему по существу идентичность с ним. Человеческие и мышинные аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот PD-1 можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, последовательности PD-1 мыши и человека соответствуют номерам доступа UniProt Q02242 и Q15116, соответственно, и имеют последовательности:

[520] PD-1 человека (номер доступа UniProt Q15116)  
 MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN  
 TSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRN  
 DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGG

LLGSLVLLVWVLAVICSRARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTP  
EPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID  
NO:1228).

[521] PD-1 мыши (номер доступа UniProt Q02242)  
MWVRQVPWSFTWAVLQLSWQSGWLLEVPNGPWRS�TFYPAWLTVSEGANATFTCSLS  
NWSIDLMLNWNRLSPSNQTEKQAAFCNGLSQPVQDARFQIIQLPNRHDFHNMILDTRR  
NDSGIYLCGAISLHPKAKIEESPGAELVVTERILETSTRYPSPSPKPEGRFQGMVIGIMSAL  
VGIPVLLLLAWALAVFCSTSMSEARGAGSKDDTLKEEPSAAPVPSVAYEELDFQGREKT  
PELPTACVHTEYATIVFTEGLGASAMGRRGSADGLQGPRPPRHEDGHCSWPL (SEQ ID  
NO:1229)

[522] «Лиганд белка программируемой гибели клеток 1 (PD-L1)», также известный как кластер дифференцировки 274, CD274, гомолог B7 1, B7-H, B7-H1, B7H1, PDCD1L1, PDCD1LG1, PDL1, hPD-L1 и молекула CD274, относится к трансмембранному белку типа 1 с молекулярной массой 40 кДа. В некоторых вариантах осуществления PD-L1 может играть основную роль в подавлении адаптивного звена иммунной системы во время определенных событий, таких как, например, беременность, тканевые аллотрансплантаты, аутоиммунное заболевание и другие болезненные состояния, такие как, например, гепатит. Как правило, адаптивная иммунная система реагирует на антигены, связанные с активацией иммунной системы, экзогенными или эндогенными сигналами опасности. В свою очередь, происходит клональная экспансия антигенспецифических CD8<sup>+</sup> Т-клеток и/или CD4<sup>+</sup> хелперов. Связывание PD-L1 с молекулой ингибирующей контрольной точки PD-1 передает ингибирующий сигнал, основанный на взаимодействии с фосфатазами (SHP-1 или SHP-2) посредством иммунорецепторного мотива переключения на основе тирозина (ITSM). Это уменьшает пролиферацию антигенспецифических Т-клеток в лимфатических узлах, одновременно уменьшая апоптоз в регуляторных Т-клетках (противовоспалительных, супрессорных Т-клетках) - дополнительно опосредовано более низкой регуляцией гена Bcl-2. PD-L1, используемый в данном документе, включает любые рекомбинантные или встречающиеся в природе формы PD-L1 или их варианты или гомологи, которые обладают или сохраняют активность PD-L1 (например, по меньшей мере 40% 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности). В некоторых аспектах варианты или гомологи имеют по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению с встречающимся в природе PD-L1. В некоторых вариантах осуществления PD-L1 по существу идентичен белку, идентифицированному под каталожным номером UniProt Q9NZQ7, или варианту или гомологу, имеющему по существу идентичность с ним.

[523] В контексте настоящего изобретения «лиганд PD-1», «PD-L1» и «PD-L2» относятся к белкам, с которыми PD-1 обладает аффинностью связывания. В некоторых

вариантах осуществления белок PD-1 или его связывающий фрагмент (такой как внеклеточный домен белка PD-1) характеризуется способностью связывать природные лиганды PD-1 человека, т.е. PD-L1 человека (также известный как CD274, номер доступа UniProt Q9NZQ7) и/или PD-L2 человека (также известный как CD273, номер доступа UniProt Q9BQ51) с такой же (т.е. равной), повышенной или сниженной (т.е. уменьшенной) аффинностью по сравнению с природным белком PD-1.

[524] Используемый в данном документе термин «слитый белок» относится к белку, который состоит из частей полипептида из разных источников. Соответственно, его также можно понимать как химерный белок. В контексте слитых белков PD-1, описанных в данном документе, термин «слитый белок» используется взаимозаменяемо с термином «рецептор-переключатель». Как правило, слитые белки представляют собой белки, созданные путем соединения двух или более генов (или предпочтительно кДНК), которые изначально кодировали отдельные белки. Трансляция этого слитого гена (или слитой кДНК) приводит к образованию одного полипептида, предпочтительно с функциональными свойствами, полученными от каждого из исходных белков. Рекомбинантные слитые белки создаются искусственно с помощью технологии рекомбинантной ДНК для использования в биологических исследованиях или терапии. Дальнейшие подробности получения слитого белка по настоящему изобретению описаны в данном документе.

[525] Термины «слитый белок PD-1», «рецептор-переключатель PD-1» или «молекула-переключатель PD-1» в данном контексте относятся к описанным слитым белкам PD-1, которые получают ингибирующий сигнал путем связывания с PD-L1 или PD-L2 и трансформируют (т.е. «переключают») сигнал через костимулирующий домен слитого белка в активирующий сигнал.

[526] Термин «IL-15», также известный как интерлейкин 15 и IL15, используемый в данном документе, относится к плейотропному цитокину, который играет важную роль в поддержании и гомеостатической экспансии различных иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления IL-15 играет критическую роль в развитии линии NK, а также в выживаемости, экспансии и функционировании NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления IL-15 способствует усилению противоопухолевого иммунитета. В некоторых вариантах осуществления IL-15 участвует в гомеостазе лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления IL-15 играет несколько ролей в функциях периферических врожденных и адаптивных иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления IL-15 играет решающую роль в индукции субпопуляции Т-клеток центральной памяти и усилении цитолитических эффекторов при транс-презентации антигенпрезентирующими клетками. В некоторых вариантах осуществления IL-15 способствует выживаемости Т-клеток за счет уменьшения индуцированной активацией гибели клеток (AICD). В некоторых вариантах осуществления белок-предшественник человеческого IL-15 имеет две известные изоформы в зависимости от длины сигнального пептида: например, IL-15 (также называемый IL-15-S48AA или IL-15LSP для «длинного

сигнального пептида») имеет сигнальный пептид и пропептид из 48 аминокислот, в то время как IL-15-S21AA или IL-15SSP (для «коротких сигнальных пептидов»), который экспрессируется из мРНК, подвергнутой альтернативному сплайсингу, имеет сигнальный пептид и пропептид из 21 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления IL-15SSP не секретируется, а хранится внутриклеточно в цитоплазме. IL-15, используемый в данном документе, включает любые рекомбинантные или встречающиеся в природе формы IL-15 или их варианты или гомологи, которые обладают или сохраняют активность IL-15 (например, по меньшей мере 40% 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности). В некоторых аспектах варианты или гомологи имеют по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению с встречающимся в природе IL-15. В некоторых вариантах осуществления IL-15 по существу идентичен белку, идентифицированному под каталожным номером UniProt P40933, или варианту или гомологу, имеющему по существу идентичность с ним.

[527] В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид IL-15 содержит аминокислоты 1-29 последовательности белка IL-15. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 1246. В некоторых вариантах осуществления IL-15 содержит аминокислоты 30-162 последовательности белка IL-15. В некоторых вариантах осуществления IL-15 содержит любую из последовательностей, перечисленных в таблице 11, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 1242.

[528] Термин «рецептор интерлейкина 15» или «IL-15R» относится к рецептору цитокинов I типа, с которым IL-15 связывается и передает сигналы через него. В некоторых вариантах осуществления IL-15R состоит из трех субъединиц: альфа-цепи рецептора IL-15 («IL-15R $\alpha$ » или CD215), бета-цепи рецептора IL-2 («IL-2R $\beta$ » или CD122) и гамма-цепи рецептора IL-2/общей гамма-цепи («IL-2R $\gamma/\gamma_c$ » или CD132). Например, в некоторых вариантах осуществления белок-предшественник IL-15R $\alpha$  человека имеет сигнальный пептид из 30 аминокислот, внеклеточный домен из 175 аминокислот, одиночный трансмембранный участок из 23 аминокислот и цитоплазматический (или внутриклеточный) домен из 39 аминокислот и содержит N- и O-связанные сайты гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления IL-15R $\alpha$  содержит домен Sushi (аминокислоты 31-95), который необходим для связывания IL-15. В некоторых вариантах осуществления IL-15R $\alpha$  существует в виде растворимой формы (sIL-15R $\alpha$ ). В некоторых вариантах осуществления sIL-15R $\alpha$  конститутивно образуется из трансмембранного рецептора посредством определенного протеолитического расщепления, и этот процесс может быть усилен некоторыми химическими агентами, такими как РМА. В некоторых вариантах осуществления человеческий sIL-15R $\alpha$  размером около 42 кДа может

продлевать период полужизни IL-15 или усиливать сигналинг IL-15 посредством связывания IL-15 и гетеродимера IL-2R $\beta$ / $\gamma$ c. Хотя IL-15R имеет общие субъединицы с IL-2R, которые содержат цитоплазматические мотивы, необходимые для сигнальной трансдукции, в некоторых вариантах осуществления сигналинг IL-15 оказывает отдельные биологические эффекты *in vivo*, за исключением многих биологических активностей, перекрывающихся с сигналингом IL-2 из-за субъединицы IL-15R $\alpha$ , уникальной для IL-15R, доступности и концентрации IL-15, кинетики и аффинности связывания IL-15-IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления IL-15 специфически с высокой аффинностью связывается с IL-15R $\alpha$ , который затем связывается с комплексом, состоящим из субъединиц IL-2R $\beta$  и IL-2R $\gamma$ / $\gamma$ c, экспрессированных на той же клетке («цис-презентация») или на другой клетке («транс-презентация»). В некоторых вариантах осуществления взаимодействие между IL-15 и IL-15R $\alpha$  не зависит от комплекса, состоящего из субъединиц IL-2R $\beta$  и IL-2R $\gamma$ / $\gamma$ c. В некоторых вариантах осуществления связывание IL-15 с гетеродимерным рецептором IL-2R $\beta$ / $\gamma$ c индуцирует активацию JAK1, которая фосфорилирует STAT3 через бета-цепь, и активацию JAK3, которая фосфорилирует STAT5 через гамма-цепь. В некоторых вариантах осуществления взаимодействие IL-15/IL-15R модулирует развитие Т-клеток и гомеостаз в CD8+ Т-клетках памяти. В некоторых вариантах осуществления взаимодействие IL-15/IL-15R также модулирует развитие, поддержание, экспансию и активность НК-клеток.

[529] «IL-15R $\alpha$ », также известный как CD215, альфа-субъединица рецептора IL-15, IL-15R-альфа, IL-15RA и альфа-субъединица рецептора интерлейкина-15, как используется в данном документе, включает любые рекомбинантные или природные формы IL-15R $\alpha$  или их варианты или гомологи, которые имеют или сохраняют активность IL-15R $\alpha$  (например, по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности). В некоторых аспектах варианты или гомологи имеют по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению с встречающимся в природе IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления IL-15R $\alpha$  по существу идентичен белку, идентифицированному под каталожным номером UniProt Q13261, или варианту или гомологу, имеющему по существу идентичность с ним.

[530] «IL-2R $\beta$ », также известный как CD122, бета-субъединица рецептора IL-2, бета-субъединица IL-2R, IL-2RB, P70-75, IMD63 и бета-субъединица рецептора интерлейкина-2, как используется в данном документе, включает любые рекомбинантные или природные формы IL-2R $\beta$  или их варианты или гомологи, которые имеют или сохраняют активность IL-2R $\beta$  (например, по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности). В некоторых аспектах варианты или гомологи имеют по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной

последовательностью по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению с встречающимся в природе IL-2R $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления IL-2R $\beta$  по существу идентичен белку, идентифицированному под каталожным номером UniProt P14784, или варианту или гомологу, имеющему по существу идентичность с ним.

[531] «Гамма-цепь рецептора IL-2/общая гамма-цепь», также известная как IL-2R $\gamma/\gamma_c$ , IL2RG, CIDX, IL-2RG, IMD4, P64, SCIDX, SCIDX1, гамма-субъединица рецептора интерлейкина 2 или CD132, как используется в данном документе, включает любые рекомбинантные или природные формы IL-2R $\gamma/\gamma_c$  или его варианты или гомологи, которые обладают или сохраняют активность IL-2R $\gamma/\gamma_c$  (например, по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности). В некоторых аспектах варианты или гомологи имеют по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению с встречающимся в природе IL-2R $\gamma/\gamma_c$ . В некоторых вариантах осуществления IL-2R $\gamma/\gamma_c$  по существу идентичен белку, идентифицированному под каталожным номером UniProt P31785, или варианту или гомологу, имеющему по существу идентичность с ним.

[532] В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический (или внутриклеточный) домен IL-15R $\alpha$  содержит аминокислоты 229-267 белка IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический (или внутриклеточный) домен IL-15R $\alpha$  содержит последовательность SEQ ID NO: 1248. В некоторых вариантах осуществления домен IL-15R $\alpha$  Sushi содержит аминокислоты 31-95 белка IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления домен IL-15R $\alpha$  Sushi содержит последовательность SEQ ID NO: 1250. В некоторых вариантах осуществления IL-15R $\alpha$  содержит трансмембранный домен и цитоплазматический (внутриклеточный) домен белка IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления IL-15R $\alpha$  содержит аминокислоты 96-267 белка IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления IL-15R $\alpha$  содержит последовательность SEQ ID NO: 1251. В некоторых вариантах осуществления sIL-15R $\alpha$  содержит аминокислоты 21-205 белка IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления sIL-15R $\alpha$  содержит последовательность SEQ ID NO: 1249.

#### Связывающий CD70 домен

[533] CD70 представляет собой тримерный трансмембранный белок типа II суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNF). CD70 может регулировать активацию, пролиферацию и дифференцировку Т- и В-клеток и может играть роль в поддержании иммунного ответа организма. CD70 связывается со своим лигандом, CD27, членом суперсемейства рецепторов TNF (TNFRSF), и впоследствии индуцирует костимуляцию Т-клеток и активацию В-клеток. При связывании с CD27 CD70 может запускать внутриклеточный сигналинг и расщепление CD27.

[534] CD70 экспрессируется на высокоактивированных Т- и В-клетках, эпителиальных клетках тимуса и некоторых дендритных клетках. Костимуляция иммунных клеток посредством связывания CD27, которое активирует костимулирующий путь CD27/CD70, может способствовать пролиферации или апоптозу. CD70 играет роль в патогенезе злокачественного новообразования. Например, CD70 может повышать частоту и активацию регуляторных Т-клеток (например, Treg) в микроокружении опухоли. При некоторых гематологических злокачественных новообразованиях (например, AML and MCL) CD70 может совместно гиперэкспрессироваться с CD27, что приводит к самосигналингу, в результате чего возникают сигналы выживаемости/пролиферации. Растворимый CD27 повышен у многих пациентов с AML и может быть связан с худшим прогнозом. Расщепленный CD27 остается связанным с CD70. Экспрессия CD70 может коррелировать со «стволовостью» злокачественного новообразования при AML и может ухудшать результаты лечения пациентов.

[535] В физиологических условиях экспрессия CD70 ограничивается транзиторной экспрессией на высокоактивированных Т-клетках и В-клетках, эпителиальных клетках тимуса и некоторых дендритных клетках, но повышается при AML, DLBCL, RCC, MPM и многих других типах злокачественного новообразования. Например, CD70 экспрессируется на высоком уровне в 38-68% случаев почечно-клеточной карциномы, в 30-60% случаев папиллярно-клеточной карциномы почки и в первичных опухолях, в которых экспрессируется CD70. Высокая экспрессия CD70 также может быть обнаружена в метастазах. Повышенный уровень экспрессии CD70 на различных типах раковых клеток делает его перспективной мишенью для противоопухолевой и гематологической иммунотерапии. Нацеливание на CD70 можно использовать для лечения пациента, имеющего злокачественное новообразование, экспрессирующее CD70.

[536] Слитые белки Т-клеточного рецептора (TCR) (TFP). Настоящее изобретение охватывает конструкции рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующие TFP и их варианты, где TFP содержит связывающий домен, например, антигенсвязывающий домен, например, антитело или фрагмент антитела, лиганд, или белок, связывающий лиганд, который специфически связывается с CD70, например, CD70 человека, где последовательность связывающего домена является смежной и находится в той же рамке считывания, что и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу TCR или ее часть. TFP, предложенные в данном документе, могут связываться с одной или более эндогенными (или, в альтернативном варианте, с одной или более экзогенными или с комбинацией эндогенных и экзогенных) субъединицами TCR с целью образования функционального комплекса TCR. TFP, который специфически связывается с описанным в данном документе CD70, может называться CD70.TFP или TFP к CD70.

[537] Настоящее раскрытие также охватывает связывающий домен, например, антитело к CD70 или его фрагмент, описанные в данном документе, которые не являются компонентом TFP к CD70. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен состоит исключительно из антитела к CD70, описанного в данном документе, и не слит с

каким-либо другим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело к CD70 или его фрагмент представляет собой компонент слитого белка, отличного от TFP, например, CAR или другого слитого белка.

[538] Предложенный в данном документе связывающий домен может быть антигенсвязывающим доменом. Антигенсвязывающий домен может представлять собой связывающий CD70 домен. Предложенный в данном документе связывающий домен может представлять собой любой домен, который связывается с CD70, включая, помимо прочего, моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, человеческое антитело, гуманизованное антитело и их функциональные фрагменты, включая, помимо прочего, однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ), переменный домен легкой цепи ( $V_L$ ) и переменный домен ( $V_{HH}$ ) наноантитела верблюжьего происхождения, а также с альтернативным каркасом, который функционирует в качестве антигенсвязывающего домена, таким как домен рекомбинантного фибронектина, антикалин, DARPIN и т. п. Аналогично природный или синтетический лиганд, специфически распознающий и связывающийся с CD70, может использоваться в качестве антигенсвязывающего домена для TFP. В некоторых случаях антигенсвязывающий домен может быть получен из того же вида, для которого будет использоваться TFP. Например, для применения у людей антигенсвязывающий домен TFP может содержать человеческие или гуманизованные остатки для антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела.

[539] В одном аспекте антигенсвязывающий домен представляет собой фрагмент, например, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В одном аспекте антигенсвязывающий домен представляет собой  $V_{HH}$ . В одном аспекте антигенсвязывающий домен представляет собой Fv, Fab, (Fab')<sub>2</sub> или бифункциональное (например, биспецифическое) гибридное антитело. В одном аспекте антитела и их фрагменты, описанные в данном документе, связываются с белком CD70 с аффинностью дикого типа или повышенной аффинностью.

[540] Гуманизованное антитело или фрагмент антитела может сохранять аналогичную антигенную специфичность, что и исходное антитело, например, в настоящем изобретении способность связываться с CD70 человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело или фрагмент антитела может иметь улучшенную аффинность и/или специфичность связывания с CD70.

[541] В одном аспекте антигенсвязывающий домен содержит гуманизованное или человеческое антитело или фрагмент антитела, или верблюжье антитело, или фрагмент антитела, или мышинное антитело, или фрагмент антитела. Антигенсвязывающий домен TFP может содержать один или более (например, все три) из определяющей комплементарности области 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющей комплементарности области 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющей комплементарности области 3 легкой цепи (CDR3 LC) гуманизованного или человеческого связывающего CD70 домена, описанного в данном документе, и/или одну

или более (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) гуманизованного или человеческого связывающего CD70 домена, описанного в данном документе, например, гуманизованный или человеческий связывающий CD70 домен содержит одну или более, например, все три, CDR LC и одну или более, например, все три, CDR HC. Антигенсвязывающий домен TFP может содержать одну или более (например, все три) определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) гуманизованного или человеческого связывающего CD70 домена, описанного в данном документе. Например, антигенсвязывающий домен TFP может содержать одну CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC. В еще одном примере антигенсвязывающий домен TFP может иметь две переменные области тяжелой цепи, каждая из которых содержит CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC, описанные в данном документе. Антигенсвязывающий домен TFP может содержать гуманизованную или человеческую переменную область легкой цепи, описанную в данном документе, и/или гуманизованную переменную область или человеческую переменную область тяжелой цепи, описанную в данном документе. Антигенсвязывающий домен TFP может содержать гуманизованную переменную область тяжелой цепи, описанную в данном документе, например, по меньшей мере, две гуманизованные или человеческие переменные области тяжелой цепи, описанные в данном документе. Антигенсвязывающий домен TFP может представлять собой scFv, содержащий легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности, представленной в данном документе. Антигенсвязывающий домен TFP может представлять собой однодоменное антитело, такое как V<sub>HH</sub>, содержащее переменную область тяжелой цепи. Антигенсвязывающий домен TFP (например, scFv или V<sub>HH</sub>) может содержать: переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20, или 10 модификаций (например, замен) аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, представленной в данном документе, или последовательность с 95-99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в данном документе; и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в данном документе, или последовательность с 95-99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в данном документе. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен TFP представляет собой scFv, и переменная область легкой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, присоединена к

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, через линкер, например, линкер, описанный в данном документе. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен TFP включает линкер (Gly4-Ser)<sub>n</sub>, где n равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 3 или 4. Вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелая цепь scFv могут находиться, например, в любой из следующих ориентаций: вариабельная область легкой цепи-линкер-вариабельная область тяжелой цепи или вариабельная область тяжелой цепи-линкер-вариабельная область легкой цепи. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит последовательность длинного линкера (LL). В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, где n=2-4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит последовательность короткого линкера (SL). В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, где n=от 1 до 3.

[542] В некоторых аспектах нечеловеческое антитело является гуманизированным, где конкретные последовательности или участки антитела модифицируют для повышения сходства с антителом, которое естественным образом вырабатывается у человека, или его фрагментом. В одном аспекте антигенсвязывающий домен является гуманизированным.

[543] Гуманизированное антитело может быть получено с использованием множества способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, прививание CDR (см., например, европейский патент № EP 239400; международную публикацию № WO 91/09967; и патенты США №№ 5225539, 5530101 и 5585089, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки), маскировку поверхностных остатков или изменение поверхности (см., например, европейские патенты №№. EP 592106 и EP 519596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; и Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973, каждая из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки), перетасовку цепей (см., например, патент США № 5565332, который полностью включен в данный документ посредством ссылки), и методы, раскрытые, например, в публикации заявки на патент США № US 2005/0042664, публикации заявки на патент США № US 2005/0048617, патенте США № 6407213, патенте США № 5766886, международной публикации № WO 9317105, Tan et al., *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002), Caldas et al., *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000), Morea et al., *Methods*, 20(3):267-79 (2000), Vaca et al., *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996), Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., *Cancer Res.*, 55(8):1717-22 (1995), Sandhu J S, *Gene*, 150(2):409-10 (1994), и Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994), каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. Часто каркасные остатки в каркасных областях будут замещены соответствующим остатком из антитела-донора CDR для изменения, например, улучшения связывания с антигеном. Эти замены каркасных остатков идентифицируют с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, например, путем

моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков для определения каркасных остатков, важных для связывания с антигеном, и сравнения последовательностей для определения необычных каркасных остатков в конкретных положениях (см., например, Queen et al., патент США 5585089; и Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки)

[544] Гуманизированное антитело или фрагмент антитела имеет один или более аминокислотных остатков, оставшихся в нем из источника нечеловеческого происхождения. Такие аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения часто называются «импортированными» остатками, которые обычно взяты из «импортированного» переменного домена. Как представлено в данном документе, гуманизированные антитела или фрагменты антител содержат одну или более CDR из молекул иммуноглобулина и каркасных областей нечеловеческого происхождения, причем аминокислотные остатки, содержащие каркас, получены полностью или в основном из зародышевой линии человека. Различные методики гуманизации антител или фрагментов антител хорошо известны в данной области техники и могут преимущественно осуществляться, следуя методу Винтера с сотрудниками (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), путем замещения CDR или последовательностей CDR грызунов на соответствующие последовательности человеческого антитела, т. е., прививание CDR (EP 239400; публикация согласно РСТ № WO 91/09967 и патент США 4816567; 6331415; 5225539; 5530101; 5585089; 6548640, содержание которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки). В таких гуманизированных антителах и фрагментах антител по существу менее чем интактный человеческий переменный домен был замещен соответствующей последовательностью отличного от человека вида. Гуманизированные антитела часто являются человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и, вероятно, некоторые каркасные (FR) остатки замещены остатками аналогичных участков антител грызунов. Гуманизация антител и фрагментов антител также может достигаться путем маскировки поверхностных остатков, или изменения поверхности (EP 592106; EP 519596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5): 489-498; Studnicka et al., *Protein Engineering* 7(6): 805-814 (1994) и Roguska et al., *PNAS* 91: 969-973 (1994)) или перетасовки цепей (патент США № 5565332), содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[545] Выбор человеческих переменных доменов, как легких, так и тяжелых, которые будут использоваться для создания гуманизированных антител, заключается в уменьшении антигенности. Согласно так называемому методу «наилучшего соответствия» проводится скрининг последовательности переменного домена антитела грызуна по всей библиотеке известных человеческих последовательностей переменного домена. Человеческая последовательность, которая будет ближайшей к последовательности грызуна, затем принимается за человеческий каркас (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987),

содержание которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки). В другом способе используют конкретную каркасную область, полученную из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Один и тот же каркас можно использовать для нескольких различных гуманизированных антител (см., например, Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993), содержание которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления каркасную область, например, все четыре каркасные области, варибельной области тяжелой цепи получают из последовательности зародышевой линии VH4-4-59. В одном варианте осуществления каркасная область может содержать одну, две, три, четыре или пять модификаций, например, замен, например, из аминокислоты в соответствующей мышинной последовательности. В одном варианте осуществления каркасная область, например, все четыре каркасные области варибельной области легкой цепи получают из последовательности зародышевой линии VK3-1.25. В одном варианте осуществления каркасная область может содержать одну, две, три, четыре или пять модификаций, например, замен, например, из аминокислоты в соответствующей мышинной последовательности.

[546] В некоторых аспектах часть композиции TFP по настоящему изобретению, которая содержит фрагмент антитела, является гуманизированной с сохранением высокой аффинности к антигену-мишени и других предпочтительных биологических свойств. В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения гуманизированные антитела и фрагменты антител получают в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов, используя трехмерные модели исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов общедоступны и знакомы специалистам в данной области техники. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных последовательностей иммуноглобулинов-кандидатов. Изучение таких отображений позволяет провести анализ вероятной роли остатков в функционировании потенциально пригодных последовательностей иммуноглобулина, например, анализ остатков, которые влияют на способность потенциально пригодного иммуноглобулина связываться с антигеном-мишенью. Следовательно, остатки FR могут выбираться и объединяться из реципиентных и импортированных последовательностей, таким образом, что будет достигаться характеристика желаемого антитела или фрагмента антитела, такая как повышенная аффинность к антигену-мишени. В целом, остатки CDR непосредственно и в существенной степени вовлечены в связывание антигена.

[547] В одном аспекте антигенсвязывающий домен (например, связывающий CD70 домен) характеризуется особыми функциональными признаками или свойствами антитела или фрагмента антитела. Например, в одном аспекте часть композиции TFP по

настоящему изобретению, которая содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывает CD70 человека. В одном аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему домену, содержащему антитело или фрагмент антитела, при этом антигенсвязывающий домен специфически связывается с белком CD70 или его фрагментом, при этом антитело или фрагмент антитела содержит переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в данном документе. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен (например, scFv или sdAb) прилегает к лидерной последовательности и находится в той же рамке считывания.

[548] В данном документе также предложены способы получения антигенсвязывающего домена антитела, специфичного в отношении антигена-мишени (например, CD70 или любого целевого антигена, описанного в другом месте в данном документе для мишеней связывающих доменов слитого фрагмента), причем способ включает обеспечение посредством добавления, делеции, замены или вставки одной или более аминокислот в аминокислотную последовательность домена  $V_H$ , указанную в данном документе, домен  $V_H$ , который представляет собой вариант аминокислотной последовательности домена  $V_H$ , необязательно объединяющий полученный таким образом домен  $V_H$  с одним или более доменами  $V_L$ , и тестирование домена  $V_H$  или комбинации или комбинаций  $V_H/V_L$  для идентификации члена специфического связывания или антигенсвязывающего домена антитела, специфичного в отношении представляющего интерес антигена-мишени (например, CD70) и, необязательно, с одним или более желаемыми свойствами.

[549] В некоторых случаях домены  $V_{HH}$  и scFv могут быть получены в соответствии со способом, известным в данной области техники (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Молекулы scFv могут быть получены путем связывания областей  $V_H$  и  $V_L$  вместе с использованием гибких полипептидных линкеров. Молекулы scFv содержат линкер (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длиной и/или аминокислотной композицией. Длина линкера может в значительной степени повлиять на то, каким образом будут складываться и взаимодействовать переменные участки. Фактически, если используется короткий полипептидный линкер (например, между 5 и 10 аминокислотами), предотвращается внутривещечный фолдинг. Внутривещечный фолдинг также требуется для того, чтобы соединить две переменные области вместе для образования сайта связывания функционального эпитопа. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит последовательность длинного линкера (LL). В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит  $(G_4S)_n$ , где  $n=2-4$ . В некоторых случаях линкерная последовательность содержит последовательность короткого линкера (SL). В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит  $(G_4S)_n$ , где  $n=1-3$ . Примеры ориентации и размера линкера см., например, в Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, патент США № 7695936, публикации заявок на

патенты США №№ 20050100543 и 20050175606 и публикации PCT №№ WO 2006/020258 и WO 2007/024715, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

[550] scFv может содержать линкер с около 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более чем 15 остатками между его участками  $V_L$  и  $V_H$ . Линкерная последовательность может содержать любую встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислоты глицин и серин. В другом варианте осуществления линкерная последовательность содержит наборы глициновых и сериновых повторов, таких как  $(G_4S)_n$ , где  $n$  представляет собой положительное целое число, равное или большее 1. В одном варианте осуществления линкер может быть  $(G_4S)_4$  или  $(G_4S)_3$ . Вариации длины линкера могут сохранять или повышать активность, обуславливая превосходную эффективность в исследованиях активности. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит последовательность длинного линкера (LL). В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит  $(G_4S)_n$ , где  $n=2-4$ . В некоторых случаях линкерная последовательность содержит последовательность короткого линкера (SL). В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит  $(G_4S)_n$ , где  $n$ =от 1 до 3.

[551] Описанный в данном документе антигенсвязывающий домен может представлять собой верблюжье антитело или его связывающий фрагмент. Антигенсвязывающий домен может представлять собой мышинное антитело или его связывающий фрагмент. Антигенсвязывающий домен может представлять собой человеческое или гуманизованное антитело или его связывающий фрагмент. Антигенсвязывающий домен может представлять собой одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) или однодоменное антитело (sdAb). Антигенсвязывающий домен может представлять собой однодоменное антитело (sdAb). sdAb может представлять собой  $V_{HH}$ .

[552] Антигенсвязывающий домен может связываться с CD70 человека со значением  $K_D$  не более около 100, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 40, 30, 20, 10, 0,5, 0,2, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 нМ или менее. В некоторых случаях значение  $K_D$  может составлять от около 0,001 нМ до около 100 нМ, от около 0,01 нМ до около 10 нМ, от около 0,1 нМ до около 10 нМ или от около 0,1 нМ до около 100 нМ. Антигенсвязывающий домен может не конкурировать с CD27 за связывание с CD70, может не ингибировать взаимодействие CD70 с CD27 и/или может не связываться с тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27. Антигенсвязывающий домен может конкурировать с CD27 за связывание с CD70, ингибировать взаимодействие CD70 с CD27 и/или связываться с тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27.

[553] Антигенсвязывающий домен содержит варибельный домен, содержащий определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3. CDR1, CDR2 и CDR3 антигенсвязывающего домена могут быть выбраны из группы, состоящей из:

CDR1, содержащей последовательность  $X_1X_2FX_3IX_4RGX_5$ ;

CDR2, содержащей последовательность  $AIX_6TSGX_7ATX_8YA$ ; и

CDR3, содержащей последовательность  $CNMEX_{11}X_{12}X_{13}YRX_{14}YW$ ;

CDR1, содержащей последовательность  $X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}YX_{20}X_{21}X_{22}$ ;

CDR2, содержащей последовательность  $X_{23}CX_{24}X_{25}SX_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}KYA$ ; и

CDR3, содержащей последовательность  $CX_{31}AAX_{32}PX_{33}DDCSVX_{34}GX_{35}YGLNYW$ ;

CDR1, содержащей последовательность  $X_{36}TFDAYAIG$ ;

CDR2, содержащей последовательность  $ICLSPSDGSTYYA$ ; и

CDR3, содержащей последовательность  $CAX_{37}PSWCSLKADFGSW$ ;

CDR1, содержащей последовательность  $SIIRDNVMA$ ;

CDR2, содержащей последовательность  $AIINX_{38}GGSX_{39}NVD$ ; и

CDR3, содержащей последовательность  $CNVYYRX_{40}LW$ ;

CDR1, содержащей последовательность  $SIFSIARMN$  или  $FTLDYYAIA$ ;

CDR2, содержащей последовательность  $AILNRAGRDTYA$ ; и

CDR3, содержащей последовательность  $CNLQTISYHDFW$ ; и

CDR1, содержащей последовательность  $SIFSATRME$ ;

CDR2, содержащей последовательность  $AIVTSGGRTNYA$ ; и

CDR3, содержащей последовательность  $CKFERYDYVNYW$ ;

где  $X_1$ - $X_{39}$  представляют собой любую природную аминокислоту.

[554] В некоторых случаях  $X_4$  представляет собой неполярную аминокислоту;  $X_5$  представляет собой полярную аминокислоту;  $X_6$  представляет собой неполярную аминокислоту;  $X_{11}$  представляет собой полярную аминокислоту;  $X_{12}$  представляет собой неполярную аминокислоту;  $X_{16}$  представляет собой полярную аминокислоту;  $X_{18}$  представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту;  $X_{21}$  представляет собой неполярную аминокислоту;  $X_{24}$  представляет собой неполярную аминокислоту;  $X_{25}$  представляет собой полярную аминокислоту;  $X_{29}$  представляет собой неполярную аминокислоту; и/или  $X_{39}$  представляет собой неполярную аминокислоту.

[555] В некоторых случаях CDR1 содержит последовательность  $X_1X_2FX_3IX_4RGX_5$ , где  $X_1$  представляет собой S или G;  $X_2$  представляет собой I или T;  $X_3$  представляет собой D или G;  $X_4$  представляет собой V или A; и  $X_5$  представляет собой S или N; CDR2 содержит последовательность  $AIX_6TSGX_7ATX_8YA$ , где  $X_8$  представляет собой I или V;  $X_9$  представляет собой G или D; и  $X_{10}$  представляет собой N или D; и CDR3 содержит последовательность  $CNMEX_{11}X_{12}X_{13}YRX_{14}YW$ , где  $X_{11}$  представляет собой S или T;  $X_{12}$  представляет собой F, V или L;  $X_{13}$  представляет собой R или S; и  $X_{14}$  представляет собой N или H.

[556] В некоторых случаях CDR1 содержит последовательность  $X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}YX_{20}X_{21}X_{22}$ , где  $X_{15}$  представляет собой F, L или R;  $X_{16}$  представляет собой T, S или N;  $X_{17}$  представляет собой L, F или R;  $X_{18}$  представляет собой D или E;  $X_{19}$  представляет собой R, H, Y, K, N;  $X_{20}$  представляет собой S, A или T;  $X_{21}$  представляет собой I, V или M; и  $X_{22}$  представляет собой G или N; CDR2 содержит последовательность  $X_{23}CX_{24}X_{25}SX_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}KYA$ , где  $X_{23}$  представляет собой S, A, T или L;  $X_{24}$  представляет собой I или V;  $X_{25}$  представляет собой S или T;  $X_{26}$  представляет собой S, K или N;  $X_{27}$  представляет собой G или S;  $X_{28}$  представляет собой G или D;  $X_{29}$  представляет

собой I, L или V; и X<sub>30</sub> представляет собой P, T, I или V; и CDR3 содержит последовательность CX<sub>31</sub>AAX<sub>32</sub>PX<sub>33</sub>DDCSVX<sub>34</sub>GX<sub>35</sub>YGLNYW, где X<sub>31</sub> представляет собой G, T или A; X<sub>32</sub> представляет собой T, G или D; X<sub>33</sub> представляет собой D, P, A или K; X<sub>34</sub> представляет собой P, A или H; и X<sub>35</sub> представляет собой H или Y.

[557] В некоторых случаях CDR1 содержит последовательность X<sub>36</sub>TFDAYAIG, где X<sub>36</sub> представляет собой F или H; CDR2 содержит последовательность ICLSPSDGSTYYA; и CDR3, содержащую последовательность CAX<sub>37</sub>PSWCSLKADFGSW, где X<sub>37</sub> представляет собой T или A; или CDR1 содержит последовательность SIIRDNVMA; CDR2 содержит последовательность AINX<sub>38</sub>GGSX<sub>39</sub>NVD, где X<sub>38</sub> представляет собой T или I; и X<sub>39</sub> представляет собой A или G; и CDR3 содержит последовательность CNVYYRX<sub>40</sub>LW, где X<sub>40</sub> представляет собой D или G.

[558] Антигенсвязывающий домен может содержать переменный домен, имеющий по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 603-620 или 622-688. Переменный домен может иметь по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 603-620 или 622-688. Переменный домен может содержать последовательность любой из SEQ ID NO: 603-620 или 622-688. Переменный домен может содержать последовательность SEQ ID NO: 605. Переменный домен может содержать последовательность SEQ ID NO: 611. Переменный домен может содержать последовательность SEQ ID NO: 613. Переменный домен может содержать последовательность SEQ ID NO: 620. Переменный домен может содержать последовательность SEQ ID NO: 618. Переменный домен может содержать последовательность SEQ ID NO: 603. Переменный домен может содержать последовательность SEQ ID NO: 615. Переменный домен может содержать последовательность SEQ ID NO: 608. Переменный домен может содержать последовательность SEQ ID NO: 610.

[559] Антигенсвязывающий домен может содержать CDR1, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 87-104 или 107-172; CDR2, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 259-276 или 279-344; и CDR3, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 431-448 или 451-516. CDR1 может представлять собой SEQ ID NO: 89, CDR2 может представлять собой SEQ ID NO: 261, а CDR3 может представлять собой SEQ ID NO: 433. CDR1 может представлять собой SEQ ID NO: 95, CDR2 может представлять собой SEQ ID NO: 267 и CDR3 может представлять собой SEQ ID NO: 439. CDR1 может представлять собой SEQ ID NO: 97, CDR2 может представлять собой SEQ ID NO: 269 и CDR3 может представлять собой SEQ ID NO: 441. CDR1 может представлять собой SEQ ID NO: 104, CDR2 может представлять собой SEQ ID NO: 276 и CDR3 может представлять собой SEQ ID NO: 448. CDR1 может представлять собой SEQ ID NO: 102, CDR2 может представлять собой SEQ ID NO: 274 и CDR3 может представлять собой SEQ ID NO: 446. CDR1 может представлять собой SEQ

ID NO: 87, CDR2 может представлять собой SEQ ID NO: 259 и CDR3 может представлять собой SEQ ID NO: 431. CDR1 может представлять собой SEQ ID NO: 99, CDR2 может представлять собой SEQ ID NO: 271 и CDR3 может представлять собой SEQ ID NO: 443. CDR1 может представлять собой SEQ ID NO: 92, CDR2 может представлять собой SEQ ID NO: 264 и CDR3 может представлять собой SEQ ID NO: 436. CDR1 может представлять собой SEQ ID NO: 94, CDR2 может представлять собой SEQ ID NO: 266 и CDR3 может представлять собой SEQ ID NO: 439.

[560] Антигенсвязывающий домен может содержать переменный домен, имеющий по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 621. Переменный домен может иметь по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 621. Переменный домен может содержать последовательность SEQ ID NO: 621. CDR1 может представлять собой SEQ ID NO: 105, CDR2 может представлять собой SEQ ID NO: 227 и CDR3 может представлять собой SEQ ID NO: 449.

[561] В некоторых случаях антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). scFv может содержать переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835. scFv может содержать переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835. scFv может содержать переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 783-835.

[562] scFv может содержать переменный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047. scFv может содержать переменный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047. scFv может содержать переменный домен легкой цепи (VL), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 995-1047. Домен VH может содержать определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDRH1), имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 836-888, CDRH2, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 889-941, и CDRH3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 942-994. Домен VL может содержать определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDRL1), имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1048-1100, CDRL2, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1101-1153, и CDRL3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1154-1206.

[563] scFv может содержать домен VH, имеющий по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800. scFv может содержать домен VH, имеющий по меньшей мере 95%

идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800. scFv может содержать домен VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 800. scFv может содержать домен VL, имеющий по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012. scFv может содержать домен VL, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012. scFv может содержать домен VL, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1012. Домен VH может содержать CDRH1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 853, CDRH2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 906 и CDRH3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 959. Домен VL может содержать CDRL1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1065, CDRL2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1118, и CDRL3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1171.

[564] scFv может содержать домен VH, имеющий по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 783. scFv может содержать домен VH, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 783. scFv может содержать домен VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 783. scFv может содержать домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 995. scFv может содержать домен VL, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 995. scFv может содержать домен VL, имеющий последовательность SEQ ID NO: 995. Домен VH может содержать CDRH1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 836, CDRH2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 889 и CDRH3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 942. Домен VL может содержать CDRL1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1048, CDRL2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1101, и CDRL3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1154.

[565] scFv может содержать домен VH, имеющий по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 784. scFv может содержать домен VH, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 784. scFv может содержать домен VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 784. scFv может содержать домен VL, имеющий по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 996. scFv может содержать домен VL, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 996. scFv может содержать домен VL, имеющий последовательность SEQ ID NO: 996. Домен VH может содержать CDRH1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 837, CDRH2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 890 и CDRH3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 943. Домен VL может содержать CDRL1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1049, CDRL2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1102, и CDRL3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1155.

[566] scFv может содержать линкерную последовательность. Линкерная

последовательность может содержать последовательность SEQ ID NO: 782.

#### Стабильность и мутации

[567] Стабильность связывающего CD70 домена, например, молекул scFv или sdAb (например, растворимых scFv или sdAb), можно оценить в отношении биофизических свойств (например, термостабильности) традиционной контрольной молекулы scFv или полноразмерного антитела. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий scFv обладает термостабильностью, которая составляет более чем около 0,1, около 0,25, около 0,5, около 0,75, около 1, около 1,25, около 1,5, около 1,75, около 2, около 2,5, около 3, около 3,5, около 4, около 4,5, около 5, около 5,5, около 6, около 6,5, около 7, около 7,5, около 8, около 8,5, около 9, около 9,5, около 10 градусов, около 11 градусов, около 12 градусов, около 13 градусов, около 14 градусов или около 15 градусов Цельсия по сравнению с исходным scFv в описанных анализах.

[568] Улучшенная термостабильность связывающего CD70 домена, например, scFv, впоследствии придается всей конструкции TFP к CD70, что приводит к улучшенным терапевтическим свойствам конструкции TFP к CD70. Термостабильность связывающего CD70 домена, например, scFv, может быть улучшена на по меньшей мере около 2°C или 3°C по сравнению с традиционным антителом. В одном варианте осуществления связывающий CD70 домен, например, scFv, имеет улучшенную на 1°C термостабильность по сравнению с традиционным антителом. В еще одном варианте осуществления связывающий CD70 домен, например, scFv, имеет улучшенную термостабильность на 2°C по сравнению с традиционным антителом. В еще одном варианте осуществления scFv имеет улучшенную на 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, или 15°C термостабильность по сравнению с традиционным антителом. Сравнения можно проводить, например, между молекулами scFv, описанными в данном документе, и молекулами scFv или Fab-фрагментами антитела, из которого были получены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> scFv. Термостабильность можно измерить, используя способы, известные в данной области техники. Например, в одном варианте осуществления можно измерить ТМ. Способы измерения ТМ и другие способы определения стабильности белка описаны ниже.

[569] Мутации в антигенсвязывающем домене, таком как scFv или sdAb (возникающие в результате гуманизации или мутагенеза растворимых scFv или sdAb), изменяют стабильность антигенсвязывающего домена и улучшают общую стабильность антигенсвязывающего домена и конструкции TFP к CD70. Стабильность гуманизованного антигенсвязывающего домена можно сравнить с мышинным антигенсвязывающим доменом с использованием таких измерений, как ТМ, температурная денатурация и температурная агрегация. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен, например, scFv или sdAb, может содержать по меньшей мере одну мутацию, возникающую в результате процесса гуманизации, так что мутировавший антигенсвязывающий домен придает улучшенную стабильность конструкции TFP к CD70. В другом варианте осуществления связывающий CD70 домен, например, scFv или sdAb,

содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мутаций, возникающих в процессе гуманизации, так что мутировавший антигенсвязывающий домен придает улучшенную стабильность конструкции TFP к CD70.

[570] В одном аспекте антигенсвязывающий домен TFP содержит аминокислотную последовательность, которая гомологична аминокислотной последовательности антигенсвязывающего домена, описанной в данном документе, а антигенсвязывающий домен сохраняет желаемые функциональные свойства фрагментов антител к CD70, описанных в данном документе. В одном конкретном аспекте композиция TFP по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В еще одном аспекте этот фрагмент антитела включает scFv или sdAb.

[571] В различных аспектах антигенсвязывающий домен TFP конструируется путем модификации одной или более аминокислот в пределах одного или обоих переменных участков (например,  $V_H$  и/или  $V_L$ ), например, в пределах одной или более областей CDR и/или в пределах одной или более каркасных областей. В одном конкретном аспекте композиция TFP по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В еще одном аспекте этот фрагмент антитела включает scFv или sdAb.

[572] Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению могут быть дополнительно модифицированы таким образом, что они будут отличаться по аминокислотной последовательности (например, от последовательности дикого типа), но не по желаемой активности. Например, дополнительные нуклеотидные замены, приводящие к аминокислотным замещениям в «заменимых» аминокислотных остатках, могут быть выполнены для белка. Например, заменимый аминокислотный остаток в молекуле может быть замещен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом варианте осуществления нить аминокислот может быть замещена структурно аналогичной нитью, которая отличается порядком и/или композицией членов семейства боковых цепей, например, может быть осуществлена консервативная замена, в которой аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь.

[573] Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

[574] Процент идентичности в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относится к двум или более последовательностям, которые являются одинаковыми. Две последовательности

являются «по существу идентичными», если две последовательности обладают указанным процентным содержанием аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (например, 60% идентичности, необязательно 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности в указанном участке или, если это не указано, во всей последовательности), при сравнении или выравнивании для максимального совпадения в окне сравнения или обозначенной области, как определено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей, либо путем выравнивания вручную и при визуальной проверке. Необязательно, идентичность существует в отношении области, составляющей в длину по меньшей мере около 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот), или более предпочтительно в отношении области, составляющей в длину от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот).

[575] Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости, обозначают координаты последовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Можно использовать программные параметры по умолчанию или указать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью на основании программных параметров. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно выполнять, например, посредством алгоритма локальной гомологии согласно Smith and Waterman, (1970) *Adv. Appl. Math.* 2: 482c, алгоритма выравнивания областей гомологии согласно Needleman and Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, поиска по методу сходства согласно Pearson and Lipman, (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, путем компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США) или ручного выравнивания и визуального осмотра (см., например, Brent et al., (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*). Двумя примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al., (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402; и Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, соответственно. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации. Параметры алгоритма для использования «нуклеотидного» BLAST для определения идентичности нуклеотидных последовательностей могут использовать параметры оценки с оценкой

совпадения/несоответствия 1,-2, где стоимость гэпов является линейной. Длина последовательности, которая инициирует выравнивание, или размер слова в алгоритме BLAST могут быть установлены равными 28 для выравнивания последовательностей. Параметры алгоритма для использования «белкового» BLAST для определения идентичности пептидных последовательностей могут использовать параметры оценки с матрицей BLOSUM62 для присвоения оценки выравнивания пар остатков и определения общей оценки выравнивания, при этом стоимость гэпа может иметь штраф за открытие гэпа, равный 11, и штраф за продление гэпа, равный 1. Способ корректировки матрицы замен для компенсации аминокислотного состава последовательностей может представлять собой условную композиционную корректировку матрицы замен. Длина последовательности, которая инициирует выравнивание, или размер слова в алгоритме BLAST могут быть установлены равными 6 для выравнивания последовательностей.

[576] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает модификации аминокислотной последовательности исходного антитела или его фрагмента (например, scFv или V<sub>HH</sub>), которые образуют функционально эквивалентные молекулы. Например, V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> связывающего домена, например, scFv или V<sub>HH</sub>, содержащегося в TFR, можно модифицировать, чтобы сохранить по меньшей мере около 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности исходной каркасной области V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> связывающего CD70 домена, например, scFv или V<sub>HH</sub>. В настоящем изобретении рассматриваются модификации всей конструкции TFR, например, модификации одной или более аминокислотных последовательностей различных доменов конструкции TFR с целью создания функционально эквивалентных молекул. Конструкция TFR может быть модифицирована для сохранения по меньшей мере около 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности исходной конструкции TFR.

[577] В некоторых вариантах осуществления связывающий CD70 компонент содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей, перечисленных в таблицах 5, 7, 8 и 9. В некоторых вариантах осуществления связывающий CD70 компонент содержит любую из последовательностей, перечисленных в таблицах 5, 7, 8 и 9.

#### Внеклеточный домен

[578] Внеклеточный домен может быть получен либо из природного, либо из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть получен из любого белка, однако в частности из связанного с мембраной или трансмембранного белка. В одном аспекте внеклеточный домен способен связываться с трансмембранным доменом. Внеклеточный домен для конкретного применения в настоящем изобретении может включать по меньшей мере внеклеточную(-ые) область(-и),

например, альфа-, бета-, гамма- или дельта-цепь Т-клеточного рецептора, или CD3-эпсилон, CD3-гамма или CD3-дельта, или в альтернативных вариантах осуществления CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В некоторых случаях внеклеточный домен TCR содержит внеклеточный домен или его часть из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединицы TCR CD3-гамма, субъединицы TCR CD3-дельта, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[579] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR содержит внеклеточный домен или его часть из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дельта-цепи TCR или гамма-цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен TCR содержит домен IgC альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дельта-цепи TCR или гамма-цепи TCR.

[580] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит или содержит по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или более последовательных аминокислотных остатков внеклеточного домена альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дельта-цепи TCR или гамма-цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, кодирующей внеклеточный домен альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дельта-цепи TCR или гамма-цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит последовательность, кодирующую внеклеточный домен альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дельта-цепи TCR или гамма-цепи TCR, имеющий укорочение по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот на N- или C-конце или как на N-, так и на C-конце.

[581] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит или содержит по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или более последовательных аминокислотных остатков домена IgC из TCR-альфа, TCR-бета, TCR-дельта или TCR-гамма. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, кодирующей домен IgC из TCR-альфа, TCR-

бета, TCR-дельта или TCR-гамма. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит последовательность, кодирующую домен IgC из TCR-альфа, TCR-бета, TCR-дельта или TCR-гамма, имеющий укорочение по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот на N- или C-конце или как на N-конце, так и на C-конце.

[582] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит или содержит по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или более последовательных аминокислотных остатков внеклеточного домена субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединицы TCR CD3-гамма или субъединицы TCR CD3 дельта. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, кодирующей внеклеточный домен из субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединицы TCR CD3-гамма или субъединицы TCR CD3-дельта. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит последовательность, кодирующую внеклеточный домен из субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединицы TCR CD3-гамма или субъединицы TCR CD3-дельта, имеющий укорочение по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот на N- или C-конце или как на N-, так и на C-конце.

#### Трансмембранный домен

[583] В целом, последовательность TFP содержит внеклеточный домен и трансмембранный домен, кодируемые одной геномной последовательностью. В альтернативных вариантах осуществления TFP может быть сконструирован с возможностью включения трансмембранного домена, который является гетерологичным внеклеточному домену TFP. Трансмембранный домен может включать одну или более дополнительных аминокислот, смежных с трансмембранной областью, например, одну или более аминокислот, связанных с внеклеточной областью белка, из которого был получен трансмембранный белок (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислот внеклеточной области), и/или одну или более дополнительных аминокислот, связанных с внутриклеточной областью белка, из которого был получен трансмембранный белок (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислот внутриклеточной области). В некоторых случаях трансмембранный домен может включать по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более аминокислот внеклеточной области. В некоторых случаях трансмембранный домен может включать по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более аминокислот внутриклеточной области. В одном аспекте применяют трансмембранный домен, который

связан с одним из доменов в TFP. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран из или модифицирован посредством аминокислотной замены во избежание связывания таких доменов с трансмембранными доменами аналогичных или различных белков поверхностной мембраны, например, для сведения к минимуму взаимодействий с другими членами рецепторного комплекса. В одном аспекте трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим TFP на поверхности TFP-T-клетки. В другом аспекте аминокислотная последовательность трансмембранного домена может быть модифицирована или замещена таким образом, чтобы минимизировать взаимодействия со связывающими доменами нативного партнера по связыванию, который присутствует в том же TFP.

[584] Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть образован из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. В одном аспекте трансмембранный домен способен к передаче сигналов внутриклеточным доменам каждый раз, когда TFP связался с мишенью. В некоторых случаях TCR-интегрирующая субъединица содержит трансмембранный домен, содержащий трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, дзета-цепи TCR, субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединицы TCR CD3-гамма, субъединицы TCR CD3-дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[585] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит или содержит по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 или более последовательных аминокислотных остатков трансмембранного домена из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединица TCR CD3-гамма или субъединицы TCR CD3-дельта. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, кодирующей трансмембранный домен из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединицы TCR CD3-гамма или субъединицы TCR CD3-дельта. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединицы TCR CD3-гамма или субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединицы TCR CD3-дельта, имеющий укорочение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более аминокислот на N- или C-конце или как на N-, так и на C-конце.

[586] В некоторых случаях трансмембранный домен может быть присоединен к

внеклеточной области TFP, например, антигенсвязывающему домену TFP посредством шарнира, например, шарнира из человеческого белка. Например, в одном варианте осуществления шарнир может представлять собой шарнир человеческого иммуноглобулина (Ig), например, шарнир IgG4 или шарнир CD8a.

#### Линкеры

[587] Необязательно короткий олиго- или полипептидный линкер длиной от 2 до 10 аминокислот может образовывать связь между связывающим элементом и внеклеточным доменом TCR из TFP. Глицин-сериновый дублет обеспечивает особенно подходящий линкер. В некоторых случаях линкер может иметь длину по меньшей мере около 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более. Например, в одном аспекте линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 690) или последовательность (GGGGS (SEQ ID NO: 1232))<sub>x</sub>, где X равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более. В некоторых вариантах осуществления X равно 2. В некоторых вариантах осуществления X равно 4. В некоторых вариантах осуществления линкер кодируется нуклеотидной последовательностью GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 691).

#### Цитоплазматический домен

[588] Цитоплазматический домен TFP может включать внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен получен из CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, TCR-альфа, TCR-бета, TCR-гамма или TCR-дельта. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, если TFP содержит полипептиды CD3-гамма, дельта или эпсилон; субъединицы TCR-альфа, TCR-бета, TCR-гамма и TCR-дельта, как правило, имеют короткие (например, длиной 1-19 аминокислот) внутриклеточные домены и, как правило, не содержат сигнальный домен. Внутриклеточный сигнальный домен, как правило, отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которую был введен TFP. Хотя внутриклеточные домены TCR-альфа, TCR-бета, TCR-гамма и TCR-дельта не имеют сигнальных доменов, они способны рекрутировать белки, имеющие первичный внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе, например, CD3-дзета, который функционирует как внутриклеточный сигнальный домен. Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, в том числе секрецию цитокинов. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка, которая передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Тогда как обычно может использоваться весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать всю цепь. В случае применения усеченной части внутриклеточного сигнального домена, такую усеченную часть можно использовать вместо интактной цепи при условии, что она передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, это означает, что термин

«внутриклеточный сигнальный домен» представляет собой включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

[589] К примерам внутриклеточных доменов для использования в TFP по настоящему изобретению относятся цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и корецепторов, которые способны действовать согласованно, иницируя трансдукцию сигнала после взаимодействия с антигенным рецептором, а также любые производные или вариант этих последовательностей и любую рекомбинантную последовательность с такой же функциональной способностью.

[590] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит внутриклеточный домен альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR, дельта-цепи TCR, субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединицы TCR CD3-гамма или субъединицы TCR CD3-дельта.

[591] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит или содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 или более последовательных аминокислотных остатков внутриклеточного домена альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR или дельта-цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, кодирующей внутриклеточный домен из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR или дельта-цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит последовательность, кодирующую внутриклеточный домен из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR или дельта-цепи TCR, имеющий укорочение по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более аминокислот на N- или C-конце или как на N-, так и на C-конце.

[592] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит или содержит по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, или 62 или более последовательных аминокислотных остатков внутриклеточного домена из субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединицы TCR CD3-гамма или субъединицы TCR CD3-дельта. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, кодирующей внутриклеточный домен из субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединицы TCR CD3-гамма или субъединицы TCR CD3-дельта. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит последовательность, кодирующую внутриклеточный домен из субъединицы TCR CD3-эпсилон, субъединицы TCR CD3-гамма или субъединицы TCR CD3-дельта, имеющий укорочение по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот на N- или C-конце или как на N-, так и на C-конце.

[593] Известно, что создаваемых только TCR сигналов недостаточно для полной активации интактных Т-клеток и что требуется вторичный и/или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация наивных Т-клеток может опосредоваться двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, что инициируют антигензависимую первичную активацию посредством TCR (первичный внутриклеточный сигнальный домен), и теми, что действуют независимым от антигенов образом для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (вторичный цитоплазматический домен, например, костимулирующий домен).

[594] Первичный сигнальный домен регулирует первичную активацию комплекса TCR либо стимулирующим путем, либо ингибирующим путем. Первичные внутриклеточные сигнальные домены, действующие стимулирующим путем, могут содержать мотивы сигналинга, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM).

[595] Примеры ITAM, содержащих домены первичного внутриклеточного сигналинга, которые предназначены для конкретного применения в настоящем изобретении, включают CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В одном варианте осуществления TFP по настоящему изобретению содержит внутриклеточный сигнальный домен, например, первичный сигнальный домен CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма. В одном варианте осуществления домен первичного сигналинга содержит модифицированный домен ITAM, например, мутировавший домен ITAM, который изменил (например, повысил или снизил) активность по сравнению с нативным доменом ITAM. В одном варианте осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит модифицированный первичный внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM, например, оптимизированный и/или усеченный первичный внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM. В одном варианте осуществления первичный сигнальный домен содержит один, два, три, четыре или более мотивов ITAM.

[596] Внутриклеточный сигнальный домен TFP может содержать сигнальный домен CD3, например, CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-гамма или CD3-дзета, сам по себе или может быть объединен с любым другим желаемым внутриклеточным сигнальным доменом(-ами), применимым в контексте TFP по настоящему изобретению. Например, внутриклеточный сигнальный домен TFP может содержать часть эпсилон-цепи CD3 и костимулирующий сигнальный домен. Костимулирующий сигнальный домен относится к части TFP, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличающуюся от рецептора антигена или его лигандов, которая требуется для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. К примерам подобных молекул относится

CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т. п. Например, было показано, что костимуляция CD27 усиливает экспансию, эффекторную функцию и выживаемость человеческих TFP-T-клеток *in vitro* и увеличивает стойкость и противоопухолевую активность человеческих T-клеток *in vivo* (Song et al., Blood. 2012; 119(3):696-706).

[597] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домен TFP получены из TCR-альфа, TCR-бета, TCR-гамма или TCR-дельта, а внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домен содержит константный домен из TCR-альфа, TCR-бета, TCR-гамма или TCR-дельта. TFP может содержать полноразмерный константный домен из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR или дельта-цепи TCR. TFP может содержать фрагмент (например, функциональный фрагмент) полноразмерного константного домена из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR или дельта-цепи TCR.

[598] Описанные в данном документе альфа-цепь TCR, бета-цепь TCR, гамма-цепь TCR или дельта-цепь TCR могут быть получены из различных видов. Цепь TCR может представлять собой цепь TCR мыши или человека. Например, TFP может содержать константный домен из альфа-цепи TCR мыши, бета-цепи TCR мыши, гамма-цепи TCR человека или дельта-цепи TCR человека.

[599] Внутриклеточные сигнальные последовательности в цитоплазматической части TFP по настоящему изобретению могут быть связаны друг с другом в случайном или заданном порядке. Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер, например, длиной от 2 до 10 аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 аминокислот) может образовать связь между внутриклеточными сигнальными последовательностями.

[600] В одном варианте осуществления глицин-сериновый дублет может использоваться в качестве подходящего линкера. В одном варианте осуществления одна аминокислота, например, аланин, глицин, может использоваться в качестве подходящего линкера.

[601] В одном аспекте клетка, экспрессирующая TFP, описанная в данном документе, может дополнительно содержать второй TFP, например, второй TFP, который включает другой антигенсвязывающий домен, например, с той же мишенью (например, CD70) или другой мишенью (например, MSLN, CD19 или MUC16). В одном варианте осуществления, когда TFP-экспрессирующая клетка содержит два или более различных TFP, антигенсвязывающие домены различных TFP могут быть такими, которые не будут взаимодействовать друг с другом. Например, клетка, экспрессирующая первый и второй TFP, может иметь антигенсвязывающий домен первого TFP, например, в виде фрагмента, например, scFv, который не ассоциирует с антигенсвязывающим доменом второго TFP, например, антигенсвязывающий домен второго TFP представляет собой  $V_{HH}$ .

[602] В другом аспекте экспрессирующая TFP клетка, описанная в данном

документе, может дополнительно экспрессировать другой агент, например, агент, который усиливает активность модифицированной Т-клетки. Например, в одном варианте осуществления агент может представлять собой агент, который ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, например, PD1, в некоторых вариантах осуществления могут снижать способность модифицированных Т-клеток вызывать иммунный эффекторный ответ. К примерам ингибирующих молекул относятся PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR-бета. В одном варианте осуществления агент, который ингибирует ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, связанную со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе. В одном варианте осуществления агент содержит первый полипептид, например, ингибирующей молекулы, например, PD1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 и TIGIT, или фрагмент любой из них (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена любой из них), и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе (например, содержащий костимулирующий домен (например, 4-1BB, CD27 или CD28, например, как описано в данном документе) и/или первичный сигнальный домен (например, сигнальный домен CD3-дзета, описанный в данном документе)). В одном варианте осуществления агент содержит первый полипептид PD1 или его фрагмент (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена PD1) и второй полипептид внутриклеточного сигнального домена, описанного в данном документе (например, сигнальный домен CD28, описанный в данном документе, и/или сигнальный домен CD3-дзета, описанный в данном документе). PD1 представляет собой ингибирующий член семейства CD28 рецепторов, которое также включает CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al., 1996, *Int. Immunol* 8:765-75). Было продемонстрировано, что два лиганда для PD1, PD-L1 и PD-L2 снижают активацию Т-клеток при связывании с PD1 (Freeman et al., 2000 *J. Exp. Med.* 192:1027-34; Latchman et al., 2001 *Nat. Immunol.* 2:261-8; Carter et al., 2002 *Eur. J. Immunol.* 32:634-43). PD-L1 в значительном количестве присутствует в злокачественных новообразованиях человека (Dong et al., 2003 *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank et al., 2005 *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi et al., 2004 *Clin. Cancer Res.* 10:5094). Иммуносупрессия может быть обратима путем ингибирования локального взаимодействия PD1 с PD-L1.

[603] В одном варианте осуществления агент содержит внеклеточный домен (ВКД) ингибирующей молекулы, например, белка программируемой гибели клеток 1 (PD1) который может быть слит с трансмембранным доменом и необязательно внутриклеточным сигнальным доменом, таким как 41BB и CD3-дзета (также называемый в данном документе как TFP к PD1). В одном варианте осуществления TFP PD1 при использовании в комбинации с TFP к CD70, описанным в данном документе, улучшает стойкость Т-клетки. В одном варианте осуществления TFP представляет собой TFP PD1,

содержащий внеклеточный домен PD-1. Альтернативно, предлагаются TFP, содержащие антитело или фрагмент антитела, такой как scFv, который специфически связывается с лигандом белка программируемой гибели клеток 1 (PD-L1) или лигандом белка программируемой гибели клеток 2 (PD-L2).

[604] В другом аспекте настоящее изобретение относится к популяции Т-клеток, экспрессирующих TFP, например, TFP-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция TFP-экспрессирующих Т-клеток содержит смесь клеток, экспрессирующих различные TFP. Например, в одном варианте осуществления популяция TFP-Т-клеток может включать первую клетку, экспрессирующую TFP, имеющий связывающий CD70 домен, описанный в данном документе, и вторую клетку, экспрессирующую TFP, имеющий связывающий домен, специфически нацеленный на другой антиген, например, связывающий домен, описанный в данном документе, который отличается от связывающего CD70 домена в TFP, экспрессируемого первой клеткой. В качестве другого примера, популяция клеток, экспрессирующих TFP, может включать первую клетку, экспрессирующую TFP, который содержит первый связывающий домен, например, как описано в данном документе, и вторую клетку, экспрессирующую TFP, который содержит антигенсвязывающий домен с мишенью, отличной от связывающего домена первой клетки (например, другим ассоциированным с опухолью антигеном).

[605] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток, где по меньшей мере одна клетка в популяции экспрессирует TFP, имеющий домен, описанный в данном документе, а вторая клетка экспрессирует другой агент, например, агент, который усиливает активность модифицированной Т-клетки. Например, в одном варианте осуществления агент может представлять собой агент, который ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, например, в некоторых вариантах осуществления могут снижать способность модифицированных Т-клеток вызывать иммунный эффекторный ответ. К примерам ингибирующих молекул относится PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR бета. В одном варианте осуществления агент, который ингибирует ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, связанную со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой цитокин. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-15. В некоторых вариантах осуществления IL-15 увеличивает стойкость Т-клеток, описанных в данном документе.

[606] Рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие TFP

[607] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие TFP, описанные в данном документе.

[608] В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит лидерную последовательность. В некоторых случаях рекомбинантная

нуклеиновая кислота дополнительно содержит промоторную последовательность. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую поли(А)-хвост. В некоторых случаях рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность 3'UTR. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту или неприродную нуклеиновую кислоту. Неприродные нуклеиновые кислоты хорошо известны специалистам в данной области техники. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой транскрибируемую *in vitro* нуклеиновую кислоту.

[609] В данном документе описаны способы получения транскрибированной *in vitro* РНК, кодирующей TFP. Настоящее изобретение также включает кодирующую TFP конструкцию РНК, которую можно непосредственно трансфицировать в клетку. Способ получения мРНК для применения при трансфекции может включать *in vitro* транскрипцию (IVT) матрицы с помощью специально разработанных праймеров с последующим добавлением поли(А) для получения конструкции, содержащей 3' и 5' нетранслируемую последовательность («UTR»), 5'-кэп и/или участок внутренней посадки рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту, подлежащую экспрессии, и поли(А)-хвост, как правило, длиной 50-2000 оснований. Полученная таким образом РНК может эффективно трансфицировать различные типы клеток. В одном аспекте матрица включает последовательности для TFP.

[610] В одном аспекте TFP к CD70 кодируется матричной РНК (мРНК). В одном аспекте мРНК, кодирующая TFP к CD70, вводят в Т-клетку для получения TFP-Т-клетки. В одном варианте осуществления транскрибированная *in vitro* РНК TFP может вводиться в клетку с помощью транзientной трансфекции. РНК получают путем транскрипции *in vitro*, используя матрицу, созданную с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Представляющую интерес ДНК из любого источника можно непосредственно преобразовать методом ПЦР в матрицу для *in vitro* синтеза мРНК с помощью соответствующих праймеров и РНК-полимеразы. Источником ДНК может быть, например, геномная ДНК, плазмидная ДНК, фаговая ДНК, кДНК, последовательность синтетической ДНК или любой другой подходящий источник ДНК. Желаемой матрицей для транскрипции *in vitro* является TFP по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления ДНК для использования в ПЦР содержит открытую рамку считывания. ДНК может быть получена из встречающейся в природе последовательности ДНК из генома организма. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота может включать некоторые или все из 5' и/или 3' нетранслируемых областей (UTR). Нуклеиновая кислота может включать экзоны и интроны. В одном варианте осуществления ДНК для использования в ПЦР представляет собой человеческую последовательность нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления ДНК для использования в ПЦР представляет собой человеческую последовательность нуклеиновой кислоты, включая 5' и 3' UTR. ДНК может альтернативно представлять собой последовательность искусственной ДНК, которая обычно не экспрессируется у встречающихся в природе организмов. Примером последовательности искусственной

ДНК является последовательность, которая содержит часть генов, которые лигируются вместе для образования открытой рамки считывания, которая кодирует слитый белок. Части ДНК, которые лигируются вместе, могут быть получены от одного организма или от более чем одного организма.

[611] ПЦР применяется для создания матрицы для *in vitro* транскрипции мРНК, которая используется для трансфекции. Способы проведения ПЦР хорошо известны в данной области техники. Праймеры для использования в ПЦР разработаны таким образом, чтобы они содержали области, которые по существу комплементарны областям ДНК, используемым в качестве матрицы для ПЦР. Как используется в данном документе, «по существу комплементарный» относится к последовательностям нуклеотидов, в которых большинство или все основания в последовательности праймеров являются комплементарными, или одно или более оснований не являются комплементарными или не совпадают. По существу комплементарные последовательности способны к ренатурации или гибридизации с предполагаемой ДНК-мишенью в условиях ренатурации, используемых для ПЦР. Праймеры могут быть разработаны таким образом, чтобы быть по существу комплементарными любой части матрицы ДНК. Например, праймеры могут быть разработаны таким образом, чтобы усиливать часть нуклеиновой кислоты, которая обычно транскрибируется в клетках (открытая рамка считывания), включая 5' и 3' UTR. Праймеры также могут быть разработаны таким образом, чтобы усиливать часть нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный домен, представляющий интерес. В одном варианте осуществления праймеры разработаны таким образом, чтобы усиливать кодирующий участок человеческой кДНК, включая все или часть 5' и 3' UTR. Праймеры, применяемые в ПЦР, могут быть получены с помощью способов синтеза, которые хорошо известны в данной области техники. «Прямые праймеры» представляют собой праймеры, которые содержат область нуклеотидов, которые по существу комплементарны нуклеотидам в матрице ДНК, которые расположены против хода транскрипции от последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована. «Расположенный выше/расположенный против хода транскрипции» используется в данном документе для обозначения места 5' от последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована, по отношению к кодирующей цепи. «Обратные праймеры» - это праймеры, которые содержат участок нуклеотидов, которые по существу комплементарны матрице двухцепочечной ДНК, которые расположены по ходу транскрипции от последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована. «Расположенный ниже/расположенный по ходу транскрипции» используется в данном документе для обозначения места 3' от последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована, по отношению к кодирующей цепи.

[612] Любая ДНК-полимераза, используемая в ПЦР, может применяться в способах, описанных в данном документе. Реагенты и полимераза коммерчески доступны из различных источников.

[613] Также могут использоваться химические структуры, способные обеспечивать

стабильность и/или эффективность трансляции. РНК предпочтительно имеет 5' и 3' UTR. В одном варианте осуществления 5' UTR имеет длину от одного до 3000 нуклеотидов. Длину последовательностей 5' и 3' UTR, которые будут добавлены к кодирующей области, можно изменить различными способами, включая, помимо прочего, разработку праймеров для ПЦР, которые ренатурируются с различными областями UTR. Используя этот подход, специалист в данной области техники может модифицировать длину 5'- и 3'-UTR, которые можно использовать для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибируемой РНК.

[614] 5' и 3' UTR могут быть природными, эндогенными 5' и 3' UTR для представляющей интерес нуклеиновой кислоты. Альтернативно, последовательности UTR, которые не являются эндогенными по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, могут быть добавлены путем введения последовательностей UTR в прямые и обратные праймеры либо с помощью любых других модификаций матрицы. Использование последовательностей UTR, которые не являются эндогенными по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, может быть полезным при модификации стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что богатые AU элементы в последовательностях 3'UTR могут снижать стабильность мРНК. Таким образом, 3' UTR могут выбираться или разрабатываться таким образом, чтобы повышать стабильность транскрибированной РНК, исходя из свойств UTR, которые хорошо известны в данной области техники.

[615] В одном варианте осуществления 5' UTR может содержать последовательность Козак эндогенной нуклеиновой кислоты. Альтернативно, при добавлении 5' UTR, которая не является эндогенной по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, путем ПЦР, как было описано выше, консенсусная последовательность Козак может быть переделана путем добавления последовательности 5' UTR. Последовательность Козак может повышать эффективность трансляции некоторых транскриптов РНК, однако похоже, что она не требуется для всех РНК, чтобы обеспечить эффективную трансляцию. В других вариантах осуществления 5' UTR может представлять собой 5' UTR РНК-вируса, чей геном РНК является стабильным в клетках. В других вариантах осуществления различные нуклеотидные аналоги могут использоваться в 3' или 5' UTR, чтобы воспрепятствовать деградации мРНК экзонуклеазами.

[616] Чтобы обеспечить синтез РНК из матрицы ДНК без необходимости использовать клонирование генов, промотор транскрипции следует присоединить к матрице ДНК выше транскрибируемой последовательности. Когда последовательность, которая действует в качестве промотора для РНК-полимеразы, добавляется к 5'-концу прямого праймера, промотор РНК-полимеразы становится включенным в продукт ПЦР выше транскрибируемой открытой рамки считывания. В одном предпочтительном варианте осуществления промотор представляет собой промотор полимеразы Т7, как описано в любом другом месте данного документа. К другим пригодным для использования промоторам относятся, помимо прочего, промоторы РНК-полимеразы Т3 и

SP6. Консенсусные нуклеотидные последовательности для промоторов T7, T3 и SP6 известны в данной области техники.

[617] В предпочтительном варианте осуществления мРНК содержит кэп на 5'-конце и 3'-поли(А)-хвост, которые определяют связывание рибосомы, инициацию трансляции и стабильность мРНК в клетке. На матрице кольцевой ДНК, например, плазмидной ДНК, РНК-полимераза вырабатывает длинный конкатемерный продукт, не пригодный для экспрессии в эукариотических клетках. Транскрипция плазмидной ДНК, линейаризованной на конце 3' UTR, приводит к получению мРНК нормального размера, которая не является эффективной при эукариотической трансфекции, даже если после транскрипции она будет полиаденилирована.

[618] На матрице линейной ДНК РНК-полимераза фага T7 может расширять 3'-конец транскрипта за пределы последнего основания матрицы (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003)).

[619] Традиционным способом интеграции поли-А/Т-участков в матрицу ДНК является молекулярное клонирование. Однако полиА/Т-последовательность, интегрированная в плазмидную ДНК, может привести к нестабильности плазмиды, что является причиной того, почему матрицы плазмидной ДНК, полученные из бактериальных клеток, часто в значительной степени загрязнены делециями и другими абберациями. Это делает процедуры клонирования не только трудоемкими и занимающими много времени, но часто и ненадежными. Поэтому крайне желательным является способ, который позволяет конструировать матрицы ДНК с поли-А/Т 3'-участком без применения клонирования.

[620] Поли-А/Т-сегмент транскрипционной матрицы ДНК может быть получен в процессе ПЦР, используя обратный праймер, содержащий поли-Т-хвост, такой как хвост 100 Т (размер может составлять 50-5000 Т), или после ПЦР с помощью любого другого способа, включая, помимо прочего, лигирование ДНК или рекомбинацию *in vitro*. Поли(А)-хвосты также обеспечивают стабильность РНК и снижают их деградацию. В целом, длина поли(А)-хвоста положительно коррелирует со стабильностью транскрибированной РНК. В одном варианте осуществления поли(А)-хвост составляет от 100 до 5000 аденозинов.

[621] Поли(А)-хвосты РНК могут быть дополнительно расширены после транскрипции *in vitro*, используя поли(А)-полимеразу, такую как поли(А)-полимераза *E. coli* (E-PAP). В одном варианте осуществления увеличение длины поли(А)-хвоста со 100 нуклеотидов до от 300 до 400 нуклеотидов приводит приблизительно к двукратному повышению эффективности трансляции РНК. Кроме того, присоединение различных химических групп к 3'-концу может увеличить стабильность мРНК. Такое присоединение может содержать модифицированные/искусственные нуклеотиды, аптамеры и другие соединения. Например, аналоги АТФ могут быть включены в поли(А)-хвост с помощью поли(А)-полимеразы. Аналоги АТФ могут дополнительно увеличивать стабильность РНК.

[622] 5'-кэпы также обеспечивают стабильность молекул РНК. В предпочтительном варианте осуществления РНК, полученные с помощью способов, описанных в данном документе, включают 5'-кэп. 5'-кэп получают с помощью методик, известных в данной области техники и описанных в данном документе (Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., *RNA*, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330:958-966 (2005)).

[623] РНК, полученные с помощью способов, описанных в данном документе, могут также содержать последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES может представлять собой любую вирусную, хромосомную или искусственно созданную последовательность, которая инициирует кэп-независимое связывание рибосомы с мРНК и способствует инициации трансляции. Могут быть добавлены любые растворенные вещества для клеточной электропорации, которые могут содержать факторы, способствующие клеточной проницаемости и жизнеспособности, такие как сахара, пептиды, липиды, белки, антиоксиданты и поверхностно-активные вещества.

[624] РНК могут вводить в клетки-мишени, используя любой из целого ряда различных способов, например, коммерчески доступные способы, которые включают, помимо прочего, электропорацию (Amaha Nucleofector-II (Amaha Biosystems, Кельн, Германия)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Бостон, штат Массачусетс) или электропоратор Gene Pulser II (BioRad, Денвер, штат Колорадо), Multiporator (Eppendorf, Гамбург, Германия), опосредованную катионными липосомами трансфекцию с использованием липофекции, инкапсуляцию полимерами, опосредованную пептидами трансфекцию или биолистические системы доставки частиц, такие как «генные пушки» (см., например, Nishikawa, et al. *Hum Gene Ther.*, 12(8):861-70 (2001)).

[625] Дополнительную информацию о получении и использовании TFP-T-клеток см. в патентах США №№ 10 442 849, 10358473, 10358474 и 10208285, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая TFP и константный домен TCR

[626] В некоторых вариантах осуществления TFP к CD70, описанный в данном документе, может дополнительно содержать последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR-альфа, константный домен TCR-бета, константный домен TCR-альфа и константный домен TCR-бета, константный домен TCR-гамма, константный домен TCR-дельта или константный домен TCR-гамма и константный домен TCR-дельта. Субъединица TCR и антитело могут быть функционально связаны. TFP может функционально включаться в комплекс TCR (например, эндогенный комплекс TCR) при экспрессии в T-клетке.

[627] Константный домен может включать константный домен альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR или дельта-цепи TCR. Константный домен может содержать полноразмерный константный домен альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-

цепи TCR или дельта-цепи TCR. Константный домен может содержать фрагмент (например, функциональный фрагмент) полноразмерного константного домена альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR или дельта-цепи TCR. Например, константный домен может содержать по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150 или более аминокислотных остатков константного домена альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR или дельта-цепи TCR. Последовательность, кодирующая константный домен TCR, может дополнительно кодировать трансмембранный домен и/или внутриклеточную область альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR или дельта-цепи TCR. Последовательность, кодирующая константный домен TCR, может кодировать полноразмерную константную область альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR или дельта-цепи TCR. Константная область цепи TCR может содержать константный домен, трансмембранный домен и внутриклеточную область. Константная область цепи TCR может также не содержать трансмембранный домен и внутриклеточную область альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR или дельта-цепи TCR.

[628] Описанные в данном документе альфа-цепь TCR, бета-цепь TCR, гамма-цепь TCR или дельта-цепь TCR могут быть получены из различных видов. Цепь TCR может представлять собой цепь TCR мыши или человека. Например, константный домен может включать константный домен альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, гамма-цепи TCR или дельта-цепи TCR мыши или человека.

[629] Константный домен TCR-альфа мыши может содержать положения 2-137 SEQ ID NO:1267. Константный домен TCR-альфа мыши может содержать укорочения, добавления или замены последовательности константного домена, описанного в данном документе. Например, константный домен может содержать укороченную версию описанного в данном документе константного домена, имеющую по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150 или более аминокислотных остатков в положениях 2-137 SEQ ID NO:1267. Например, константный домен может содержать последовательность, имеющую по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150 или более дополнительных аминокислотных остатков в положениях 2-137 SEQ ID NO:1267. Например, константный домен может содержать последовательность, имеющую по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150 или более аминокислотных замен в положениях 2-137 SEQ ID NO:1267. Константный домен может содержать последовательность или ее фрагмент в положениях 2-137 SEQ ID NO:1267. Константный домен может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более модификаций, мутаций или делеций последовательности в положениях 2-137 SEQ ID NO:1267. Константный домен может содержать не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 модификации, мутации или делеции последовательности в положениях 2-137 SEQ ID NO:1267. Константный домен может содержать последовательность, имеющую по меньшей мере около 40%, 45%, 50%, 55%,

60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью из положений 2-137 SEQ ID NO:1267.

[630] Константный домен TCR-бета мыши может содержать положения 2-173 SEQ ID NO:1268. Константный домен TCR-бета мыши может содержать укорочения, добавления или замены последовательности константного домена, описанного в данном документе. Например, константный домен может содержать укороченную версию описанного в данном документе константного домена, имеющую по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150 или более аминокислотных остатков в положениях 2-173 SEQ ID NO:1268. Например, константный домен может содержать последовательность, имеющую по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150 или более дополнительных аминокислотных остатков в положениях 2-173 SEQ ID NO:1268. Например, константный домен может содержать последовательность, имеющую по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150 или более аминокислотных замен в положениях 2-173 SEQ ID NO:1268. Константный домен может содержать последовательность или ее фрагмент в положениях 2-173 SEQ ID NO:1268. Константный домен может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более модификаций, мутаций или делеций последовательности в положениях 2-173 SEQ ID NO:1268. Константный домен может содержать не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 модификации, мутации или делеции последовательности в положениях 2-173 SEQ ID NO:1268. Константный домен может содержать последовательность, имеющую по меньшей мере около 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью из положений 2-173 SEQ ID NO:1268.

[631] Константный домен TCR-гамма может содержать SEQ ID NO:721, ее функциональные фрагменты и их аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях последовательность, кодирующая константный домен TCR-гамма, дополнительно кодирует переменный домен TCR-гамма, тем самым кодируя полный домен TCR-гамма. Полный домен TCR-гамма может представлять собой гамма-9 или гамма-4. Полный домен TCR-гамма может содержать SEQ ID NO:1269, ее функциональные фрагменты и их аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[632] Константный домен TCR-дельта может содержать SEQ ID NO:725, ее функциональные фрагменты или их аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях последовательность, кодирующая константный домен TCR-дельта, дополнительно кодирует переменный домен TCR-дельта, тем самым кодируя полный домен TCR-дельта. Полный домен TCR-дельта может представлять собой дельта-2 или дельта-1. Полный константный домен TCR-дельта может содержать SEQ ID NO:1270, ее

функциональные фрагменты и их аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

[633] В некоторых случаях последовательность, кодирующая константный домен TCR, может дополнительно кодировать второй антигенсвязывающий домен или лигандсвязывающий домен, который функционально связан с последовательностью, кодирующей константный домен TCR.

[634] В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-альфа и/или TCR-бета экспрессируется с TFP в клетке, в которой TRAC или TRBC были инактивированы. В некоторых вариантах осуществления константный домен TCR-гамма и/или TCR-дельта экспрессируется с TFP в клетке, в которой TRAC или TRBC были инактивированы.

#### Молекула-переключатель

[635] В некоторых случаях модифицированные T-клетки дополнительно содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанную со вторым полипептидом, содержащим положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена. В некоторых случаях ингибирующая молекула содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть PD-1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления T-клетка, экспрессирующая TFP, как описано в данном документе, и молекула-переключатель PD-1, как описано в данном документе, могут ингибировать рост опухоли при экспрессии в T-клетке.

[636] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие первую последовательность, кодирующую TFP, как описано в данном документе, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую агент, который может усиливать активность модифицированной T-клетки, экспрессирующей TFP, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты включена в отдельную последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты включена в ту же молекулу нуклеиновой кислоты, что и молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Например, в одном варианте осуществления агент, который может усиливать активность модифицированной T-клетки, может представлять собой полипептид PD-1. В этих вариантах осуществления полипептид PD-1 может быть функционально связан с N-концом внутриклеточного домена костимулирующего полипептида через C-конец полипептида PD-1. Например, в другом варианте осуществления агент, который может усиливать активность модифицированной T-клетки, может представлять собой антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент. В этом варианте осуществления антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть функционально связаны с N-концом внутриклеточного домена

костимулирующего полипептида через С-конец антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления полипептид PD-1 или антитело к PD-1 связаны с внутриклеточным доменом костимулирующего полипептида через трансмембранный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий полипептид выбран из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD5, ICAM-1, ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD28, CD30, CD40, IL-15Ra, IL12R, IL18R, IL21R, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, CD226, FcγRI, FcγRII, и FcγRIII. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий пептид представляет собой CD28.

[637] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие последовательность, кодирующую TFP, как описано в данном документе, где молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты дополнительно содержат агент, который может усиливать активность модифицированной Т-клетки, экспрессирующей TFP, как описано в данном документе. В другом аспекте клетки, экспрессирующие TFP, как описано в данном документе, могут дополнительно экспрессировать другой агент, например, агент, который усиливает активность модифицированной Т-клетки. Например, в одном варианте осуществления агент может представлять собой агент, который ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, например, PD-1, в некоторых вариантах осуществления могут снижать способность модифицированных Т-клеток вызывать иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибирующих молекул включают PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, и 2B4. В одном варианте осуществления агент, который ингибирует ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, связанную со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, например, внутриклеточный сигнальный домен, как описано в данном документе. В одном варианте осуществления агент содержит первый полипептид, например, ингибирующей молекулы, такой как PD-1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 и TIGIT, или фрагмент любого из них (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена любого из них), и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе (например, содержащий костимулирующий домен (например, 4-1BB, CD27 или CD28, например, как было описано в данном документе) и/или первичный сигнальный домен (например, сигнальный домен CD3-дзета, описанный в данном документе)). В одном варианте осуществления агент содержит первый полипептид PD-1 или его фрагмент (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена PD-1) и второй полипептид внутриклеточного сигнального домена, описанного в данном документе (например, сигнальный домен CD28, описанный в данном документе, и/или сигнальный домен CD3-дзета, описанный в данном документе). В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, дополнительно содержат последовательность, кодирующую PD-1 или

его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, дополнительно содержат последовательность, кодирующую внеклеточный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, содержат последовательность, кодирующую внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, могут дополнительно содержать последовательность, кодирующую CD28 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, содержат последовательность, кодирующую внутриклеточный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, содержат последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1, связанный с внутриклеточным доменом CD28, связанным с внутриклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления агент содержит внеклеточный и трансмембранный домен PD-1, слитый с внутриклеточным сигнальным доменом CD28. В некоторых вариантах осуществления агент содержит SEQ ID NO: 1239. PD1 представляет собой ингибирующий член семейства CD28 рецепторов, которое также включает CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al., 1996, *Int. Immunol* 8:765-75). Было показано, что два лиганда для PD1, PD-L1 и PD-L2, подавляют активацию Т-клеток при связывании с PD1 (Freeman et al., 2000 *J. Exp. Med.* 192:1027-34; Latchman et al., 2001 *Nat. Immunol.* 2:261-8; Carter et al., 2002 *Eur. J. Immunol.* 32:634-43). PD-L1 в значительном количестве присутствует в злокачественных новообразованиях человека (Dong et al., 2003 *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank et al., 2005 *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi et al., 2004 *Clin. Cancer Res.* 10:5094). Иммуносупрессия может быть обратима путем ингибирования локального взаимодействия PD1 с PD-L1.

[638] В одном варианте осуществления агент содержит внеклеточный домен (ВКД) ингибирующей молекулы, например, PD-1, который может быть слит с трансмембранным доменом и необязательно внутриклеточным сигнальным доменом, таким как 41BB и CD3-дзета (также называемый в данном документе как TFP PD-1). В одном варианте осуществления TFP PD-1 при использовании в комбинации с TFP к ТАА, описанным в данном документе, улучшает стойкость Т-клеток. В одном варианте осуществления TFP представляет собой TFP PD-1, содержащий внеклеточный домен PD-1. Альтернативно, предлагаются TFP, содержащие антитело или фрагмент антитела, такой как scFv, который специфически связывается с лигандом белка программируемой гибели клеток 1 (PD-L1) или лигандом белка программируемой гибели клеток 2 (PD-L2).

[639] В одном аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток, где по меньшей мере одна клетка в популяции экспрессирует TFP, имеющий домен, описанный в данном документе, а вторая клетка экспрессирует другой агент, например,

агент, который усиливает активность модифицированной Т-клетки. Например, в одном варианте осуществления агент может представлять собой агент, который ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, например, в некоторых вариантах осуществления могут снижать способность модифицированных Т-клеток вызывать иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибирующих молекул включают PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, и 2B4. В одном варианте осуществления агент, который ингибирует ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, связанную со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе.

Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая молекулу-переключатель

[640] В данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), описанный в данном документе, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу-переключатель, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержат первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанную со вторым полипептидом, содержащим положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена. В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержат первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ингибирующую молекулу, содержащую первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть PD-1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка, экспрессирующая TFP, как описано в данном документе, и молекула-переключатель PD-1, как описано в данном документе, могут ингибировать рост опухоли при экспрессии в Т-клетке.

Полипептиды IL-15 и альфа-рецептора IL-15

[641] В некоторых аспектах клетки, экспрессирующие TFP, описанные в данном документе, могут дополнительно экспрессировать другой агент, например, агент, который может повышать продолжительность жизни или активность клеток, экспрессирующих TFP, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой цитокин, такой как плеiotропный цитокин, который играет важную роль в поддержании и гомеостатической экспансии иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления локальная секреция плеiotропного цитокина в микроокружении опухоли (TME) может способствовать усилению противоопухолевого

иммунитета. В некоторых вариантах осуществления агент активирует сигналинг цитокина. В некоторых вариантах осуществления агент активирует сигналинг интерлейкина-15 (IL-15). В некоторых вариантах осуществления агент включает интерлейкин-15 (IL-15) и/или рецептор интерлейкина-15 (IL-15R). В некоторых вариантах осуществления IL-15R представляет собой субъединицу IL-15R-альфа (IL-15R $\alpha$ ).

[642] Настоящее изобретение охватывает молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент содержит 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 или более последовательных аминокислотных остатков IL-15. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, кодирующей IL-15. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент содержит последовательность, кодирующую IL-15, имеющую укорочение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот на N- или C-конце или как на N-, так и на C-конце.

[643] В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент могут содержать сигнальный пептид IL-15. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент могут содержать аминокислоты 1-29 IL-15. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент могут содержать аминокислоты 1-29 SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент могут содержать последовательность SEQ ID NO: 1246. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент могут содержать аминокислоты 30-162 IL-15. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент могут содержать аминокислоты 30-162 SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент могут содержать любую из последовательностей, перечисленных в таблице 11, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент могут содержать последовательность SEQ ID NO: 1242. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент могут содержать аминокислоты 1-162 SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент могут содержать последовательность SEQ ID NO: 1246 и последовательность SEQ ID NO: 1242. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 секретируется при экспрессии в

клетке, такой как Т-клетка.

[644] Настоящее раскрытие дополнительно охватывает молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид субъединицы рецептора интерлейкина-15 (IL-15R) или его фрагмент. Например, субъединицей IL-15R может быть альфа-цепь рецептора IL-15 («IL-15R $\alpha$ » или CD215), бета-цепь рецептора IL-2 («IL-2R $\beta$ » или CD122) и гамма-цепь рецептора IL-2/общая гамма-цепь («IL-2R $\gamma/\gamma_c$ » или CD132). В некоторых вариантах осуществления субъединица IL-15R представляет собой IL-15R $\alpha$  или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент содержит 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, или более последовательных аминокислотных остатков IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, кодирующей IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент содержит последовательность, кодирующую IL-15R $\alpha$ , имеющую укорочение по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или более аминокислот на N- или C-конце или как на N-, так и на C-конце.

[645] В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать сигнальный пептид IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать аминокислоты 1-30 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать аминокислоты 1-30 SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент не содержат сигнальный пептид IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент не содержат аминокислоты 1-30 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент не содержат аминокислоты 1-30 SEQ ID NO: 1247.

[646] В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать домен Sushi из IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать аминокислоты 31-95 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать аминокислоты 31-95 SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать последовательность SEQ ID NO: 1250.

[647] В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать аминокислоты 229-267 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать аминокислоты 229-267 последовательности SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать последовательность SEQ ID NO: 1248.

[648] В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать домен Sushi, трансмембранный домен и внутриклеточный домен из IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать аминокислоты 31-267 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать аминокислоты 31-267 SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать последовательность SEQ ID NO: 1250. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать последовательность SEQ ID NO: 1251. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать аминокислоты 96-267 SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать последовательность SEQ ID NO: 1250 и последовательность SEQ ID NO: 1251.

[649] В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент может представлять собой растворимый IL-15R $\alpha$  (sIL-15R $\alpha$ ). В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать аминокислоты 21-205 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать аминокислоты 21-205 последовательности SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент могут содержать последовательность SEQ ID NO: 1249.

[650] Настоящее изобретение охватывает молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующие слитый белок, содержащий полипептид IL-15, связанный с субъединицей IL-15R. В некоторых вариантах осуществления IL-15 и субъединица IL-15R функционально связаны линкером. В некоторых вариантах осуществления субъединица IL-15R представляет собой IL-15R-альфа (IL-15R $\alpha$ ). Например, полипептид IL-15 может быть связан с N-концом субъединицы IL-15R $\alpha$ . Например, полипептид IL-15 может быть связан с C-концом субъединицы IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления IL-15 и

IL-15R $\alpha$  функционально связаны линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер не является расщепляемым линкером. Например, линкер может содержать последовательность, содержащую (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, где G представляет собой глицин, S представляет собой серин, а n представляет собой целое число от 1 до 10. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления n равно 3. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 1243.

[651] В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать аминокислоты 30-162 IL-15. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать аминокислоты 30-162 последовательности SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать любую из последовательностей, перечисленных в таблице 11, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать последовательность SEQ ID NO: 1242. В некоторых вариантах осуществления слитый белок не содержит сигнальный пептид IL-15. В некоторых вариантах осуществления слитый белок не содержит аминокислоты 1-29 IL-15. В некоторых вариантах осуществления слитый белок не содержит аминокислоты 1-29 последовательности SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления слитый белок не содержит последовательность SEQ ID NO: 1246.

[652] В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать домен Sushi. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать аминокислоты 31-95 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать аминокислоты 31-95 последовательности SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать последовательность SEQ ID NO: 1250.

[653] В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать аминокислоты 229-267 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать аминокислоты 229-267 последовательности SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать последовательность SEQ ID NO: 1248.

[654] В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать растворимый IL-15R $\alpha$  (sIL-15R $\alpha$ ). В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать аминокислоты 21-205 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать аминокислоты 21-205 последовательности SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать последовательность SEQ ID NO: 1249.

[655] В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать трансмембранный домен и внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать аминокислоты 96-267 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать аминокислоты 96-

267 последовательности SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать последовательность SEQ ID NO: 1251.

[656] В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать домен Sushi, трансмембранный домен и внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать аминокислоты 31-267 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать аминокислоты 31-267 последовательности SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать последовательность SEQ ID NO: 1250 и последовательность SEQ ID NO: 1251.

[657] В некоторых вариантах осуществления слитый белок дополнительно содержит эпитопную метку. Эпитопная метка, как описано в данном документе, может быть пептидной эпитопной меткой или белковой эпитопной меткой. Примеры пептидной эпитопной метки включают, но не ограничиваются ими, 6X His (также известную как His-метка или гексагистидиновая метка), FLAG (например, 3X FLAG), HA, Muc и V5. Примеры белковой эпитопной метки включают, но не ограничиваются ими, зеленый флуоресцентный белок (GFP), глутатион-S-трансферазу (GST),  $\beta$ -галактозидазу ( $\beta$ -GAL), люциферазу, белок, связывающий мальтозу (MBP), красный флуоресцентный белок (RFP) и гликопротеин вируса везикулярного стоматита (VSV-G). В некоторых вариантах осуществления слитый белок дополнительно содержит метку FLAG. В некоторых вариантах осуществления слитый белок дополнительно содержит метку 3X FLAG. В некоторых вариантах осуществления слитый белок дополнительно содержит последовательность SEQ ID NO: 1255.

[658] Flag x3 DYKDDDDKDYKDDDDKDYKDDDDK (SEQ ID NO: 1255)

[659] В некоторых вариантах осуществления слитый белок экспрессируется на клеточной поверхности при экспрессии в Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления слитый белок секретируется при экспрессии в Т-клетке.

[660] В некоторых аспектах клетки, экспрессирующие TFP, полипептид IL-15 или его фрагмент, полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, и/или слитый белок, содержащий полипептид IL-15 и полипептид IL-15R $\alpha$ , описанные в данном документе, могут дополнительно экспрессировать другой агент, который может усилить активность модифицированной Т-клетки, экспрессирующей TFP. Например, в одном варианте осуществления агент, который может усиливать активность модифицированной Т-клетки, может представлять собой полипептид PD-1. В этих вариантах осуществления полипептид PD-1 может быть функционально связан с N-концом внутриклеточного домена костимулирующего полипептида через C-конец полипептида PD-1. Например, в другом варианте осуществления агент, который может усиливать активность модифицированных Т-клеток, экспрессирующих TFP, может представлять собой антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент. В этом варианте осуществления антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть функционально связаны с N-концом внутриклеточного домена костимулирующего полипептида через C-конец антитела к PD-1

или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления полипептид PD-1 или антитело к PD-1 связаны с внутриклеточным доменом костимулирующего полипептида через трансмембранный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий полипептид выбран из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD28, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, CD226, FcγRI, FcγRII, и FcγRIII. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий полипептид представляет собой CD28.

[661] В некоторых аспектах агент, который может усиливать активность модифицированных Т-клеток, экспрессирующих TFP, может быть связан с полипептидом IL-15Rα или его фрагментом. Например, агент может представлять собой агент, который может ингибировать ингибирующую молекулу, которая может снижать способность Т-клетки, экспрессирующей TFP, вызывать иммунный эффекторный ответ. В некоторых вариантах осуществления агент, который ингибирует ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, связанную со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе. В одном варианте осуществления агент может содержать первый полипептид, например, ингибирующей молекулы, например, PD-1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4, и TIGIT, или фрагмент любой из них (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена любой из них), и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе (например, содержащий костимулирующий домен (например, 4-1BB, CD27, или CD28, как описано в данном документе)) и/или первичный сигнальный домен (например, IL-15Rα, описанный в данном документе). В некоторых вариантах осуществления агент может представлять собой PD-1 или его фрагмент. Например, агент может содержать внеклеточный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления агент может содержать внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления агент может дополнительно содержать CD28 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления агент может содержать внутриклеточный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления агент может содержать слитый белок, содержащий внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1, связанный с внутриклеточным доменом CD28, связанным с IL-15Rα. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CD28 связан с внутриклеточным доменом IL-15Rα.

[662] В некоторых вариантах осуществления PD-1 или его фрагмент могут содержать любую из последовательностей, перечисленных в таблице 10, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления PD-1 или его фрагмент могут содержать последовательность SEQ ID NO: 1256. В некоторых вариантах осуществления PD-1 или его фрагмент могут содержать последовательность SEQ ID NO: 1257. В некоторых вариантах осуществления PD-1 или его фрагмент могут содержать последовательность

SEQ ID NO: 1258. В некоторых вариантах осуществления PD-1 или его фрагмент могут содержать последовательность SEQ ID NO: 1259. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен PD-1 может содержать последовательность SEQ ID NO: 1239. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CD28 может содержать последовательность SEQ ID NO: 1260. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$  содержит аминокислоты 229-267 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$  содержит аминокислоты 229-267 последовательности SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит последовательность SEQ ID NO: 1248.

[663] В некоторых аспектах агент, который может усиливать активность модифицированных Т-клеток, экспрессирующих TFP, может быть связан со слитым белком, содержащим полипептид IL-15 и полипептид IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления агент может представлять собой PD-1 или его фрагмент. Например, агент может содержать внеклеточный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления агент может содержать внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления агент может дополнительно содержать CD28 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления агент может содержать внутриклеточный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления агент может содержать слитый белок, содержащий внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1, связанный с внутриклеточным доменом CD28, связанным со слитым белком, содержащим полипептид IL-15 и полипептид IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CD28 связан с внутриклеточным доменом IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$  связан с полипептидом IL-15 с помощью линкера, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит сайт расщепления. Сайт расщепления может представлять собой саморасщепляющийся пептид, такой как сайт расщепления T2A, P2A, E2A или F2A. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления может содержать последовательность SEQ ID NO: 1261 (P2A: GSGATNFSLLKQAGDVEENPG).

[664] В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать PD-1 или его фрагмент, содержащий любую из последовательностей, перечисленных в таблице 10, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать PD-1 или его фрагмент, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1256. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать PD-1 или его фрагмент, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1257. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать PD-1 или его фрагмент, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1258. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать PD-1 или его фрагмент, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1259. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может содержать PD-1 или его фрагмент, содержащий трансмембранный домен PD-1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1239. В некоторых вариантах осуществления слитый

белок может содержать CD28 или фрагмент, содержащий внутриклеточный домен CD28, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1260. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$  содержит аминокислоты 229-267 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$  содержит аминокислоты 229-267 последовательности SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит последовательность SEQ ID NO: 1248. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 содержит сигнальный пептид IL-15. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 содержит аминокислоты 1-29 IL-15. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 содержит аминокислоты 1-29 последовательности SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 1246. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 содержит аминокислоты 30-162 IL-15. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 содержит аминокислоты 30-162 последовательности SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 1242.

[665] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны полипептиды, кодируемые любой из молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанных в данном документе.

Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая IL-15 и/или IL-15R $\alpha$

[666] В данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), описанный в данном документе, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент. В данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид альфа-рецептора интерлейкина-15 (IL-15R $\alpha$ ) или его фрагмент. Также в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты: первая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), и вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, содержащий полипептид IL-15 или его фрагмент, связанный с полипептидом IL-15R $\alpha$  или его фрагментом. Дополнительно в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты: первая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), и вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, содержащий слитый белок, содержащий полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, связанный с PD-1 или его фрагментом и/или CD28 или его фрагментом.

[667] В данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую



последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связаны первым линкером. Например, первый линкер может быть расщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления первый линкер может содержать сайт расщепления протеазой. Сайт расщепления может представлять собой саморасщепляющийся пептид, например, сайт расщепления 2A, такой как сайт расщепления T2A, P2A, E2A или F2A. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления протеазой представляет собой сайт расщепления T2A. Сайт расщепления может содержать последовательность SEQ ID NO: 1238 при экспрессии. В некоторых вариантах осуществления первый линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 1238 при экспрессии.

[669] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую сигнальный пептид IL-15. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид IL-15 содержит аминокислоты 1-29 SEQ ID NO: 1245 при экспрессии. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 1246 при экспрессии. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 30-162 SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую любую из последовательностей, перечисленных в таблице 11, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1242. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 1-162 SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1246 и последовательность SEQ ID NO: 1242. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент секретируется при экспрессии в Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 1242 при экспрессии.

[670] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, описанный в данном документе, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IL-15 или его фрагмент, и субъединицу IL-15R или ее фрагмент, при этом первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в две отдельные молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых

вариантах осуществления в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, описанный в данном документе, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IL-15 или его фрагмент, и субъединицу IL-15R или ее фрагмент, при этом первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в одну молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связаны первым линкером, описанным в данном документе. Субъединицей IL-15R может быть IL-15R-альфа (IL-15R $\alpha$ ), IL-2R-бета (IL-2 $\beta$ ) или IL-2R-гамма/общая гамма цепь (IL-2R $\gamma/\gamma_c$ ). В некоторых вариантах осуществления субъединица IL-15R представляет собой IL-15R-альфа (IL-15R $\alpha$ ). В некоторых вариантах осуществления IL-15 и субъединица IL-15R функционально связаны вторым линкером. В некоторых вариантах осуществления IL-15 и IL-15R $\alpha$  функционально связаны вторым линкером. В некоторых вариантах осуществления второй линкер не является расщепляемым линкером. Например, второй линкер может содержать последовательность, содержащую (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, где G представляет собой глицин, S представляет собой серин, а n представляет собой целое число от 1 до 10. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления n равно 3. В некоторых вариантах осуществления второй линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 1243.

[671] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 229-267 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 229-267 SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1248.

[672] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую домен Sushi IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 31-95 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 31-95 SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты,



документе, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый белок, содержащий полипептид IL-15, связанный с субъединицей IL-15R $\alpha$ , где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в две отдельные молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, описанный в данном документе, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый белок, содержащий полипептид IL-15, связанный с субъединицей IL-15R $\alpha$ , где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в одну молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связаны первым линкером, описанным в данном документе. Например, полипептид IL-15 может быть связан с N-концом субъединицы IL-15R $\alpha$ . Например, полипептид IL-15 может быть связан с C-концом субъединицы IL-15R $\alpha$ .

[677] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 1-29 IL-15. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 1-29 SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1246. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 30-162 IL-15. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 30-162 SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую любую из последовательностей, перечисленных в таблице 11, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1242. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 1-162 IL-15. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 1-162 SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1246, и последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1242.



последовательность SEQ ID NO: 1251.

[682] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую растворимый IL-15R $\alpha$  (sIL-15R $\alpha$ ). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 21-205 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 21-205 SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может содержать последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1249.

[683] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, может дополнительно содержать последовательность, кодирующую эпитопную метку. Эпитопная метка, как описано в данном документе, может быть пептидной эпитопной меткой или белковой эпитопной меткой. Примеры пептидной эпитопной метки включают, но не ограничиваются ими, 6X His (также известную как His-метка или гексагистидиновая метка), FLAG (например, 3X FLAG), HA, Muc и V5. Примеры белковой эпитопной метки включают, но не ограничиваются ими, зеленый флуоресцентный белок (GFP), глутатион-S-трансферазу (GST),  $\beta$ -галактозидазу ( $\beta$ -GAL), люциферазу, белок, связывающий мальтозу (MBP), красный флуоресцентный белок (RFP) и гликопротеин вируса везикулярного стоматита (VSV-G). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, дополнительно содержит последовательность, кодирующую метку FLAG. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, дополнительно содержит последовательность, кодирующую метку 3X FLAG. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, дополнительно содержит последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1255.

[684] В некоторых вариантах осуществления слитый белок экспрессируется на клеточной поверхности при экспрессии из рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, в Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления слитый белок секретируется при экспрессии из рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, в Т-клетке.

[685] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный в данном документе TFP, вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IL-15 или его фрагмент, и третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую агент, который может усиливать активность модифицированных Т-клеток,

экспрессирующих TFP. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты включена в отдельную последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты включена в ту же молекулу нуклеиновой кислоты, что и первая последовательность нуклеиновой кислоты, или вторая последовательность нуклеиновой кислоты, или первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты. Например, в одном варианте осуществления агент, который может усиливать активность модифицированной Т-клетки, может представлять собой полипептид PD-1. В этих вариантах осуществления полипептид PD-1 может быть функционально связан с N-концом внутриклеточного домена костимулирующего полипептида через C-конец полипептида PD-1. Например, в другом варианте осуществления агент, который может усиливать активность модифицированной Т-клетки, может представлять собой антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент. В этом варианте осуществления антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть функционально связаны с N-концом внутриклеточного домена костимулирующего полипептида через C-конец антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления полипептид PD-1 или антитело к PD-1 связаны с внутриклеточным доменом костимулирующего полипептида через трансмембранный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий полипептид выбран из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD28, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, CD226, FcγRI, FcγRII, и FcγRIII.

[686] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, описанный в данном документе, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IL-15Rα или его фрагмент, где первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связаны первым линкером, описанным в данном документе, и при этом вторая последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно кодирует агент, который может усиливать активность модифицированной Т-клетки, экспрессирующей TFP. Например, агент может представлять собой агент, который может ингибировать ингибирующую молекулу, которая может снижать способность Т-клетки, экспрессирующей TFP, вызывать иммунный эффекторный ответ. В некоторых вариантах осуществления агент, который ингибирует ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, связанную со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе. В одном варианте осуществления агент может содержать первый полипептид, например, ингибирующей молекулы, например, PD-1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4, и TIGIT, или фрагмент любой из них (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена любой из них), и второй полипептид, который

представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе (например, содержащий костимулирующий домен (например, 4-1BB, CD27, или CD28, как описано в данном документе)) и/или первичный сигнальный домен (например, IL-15R $\alpha$ , описанный в данном документе). В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую PD-1 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую внеклеточный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать последовательность, кодирующую CD28 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую внутриклеточный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1, связанный с внутриклеточным доменом CD28, связанным с IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CD28 связан с внутриклеточным доменом IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$  содержит аминокислоты 229-267 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$  содержит аминокислоты 229-267 SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$  содержит последовательность SEQ ID NO: 1248.

[687] В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая PD-1 или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из последовательностей, перечисленных в таблице 10, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая PD-1 или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1256. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая PD-1 или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1257. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая PD-1 или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1258. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая PD-1 или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1259. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая трансмембранный домен PD-1, может содержать последовательность нуклеиновой

кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1239. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая внутриклеточный домен CD28, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1260. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$  содержит аминокислоты 229-267 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$ , содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислоты 229-267 SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$ , содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1248.

[688] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, описанный в данном документе, вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, и агент, который может усиливать активность модифицированной Т-клетки, экспрессирующей описанный в данном документе TFP, и третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IL-15 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в две отдельные последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в одну последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связаны первым линкером, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты включена в отдельную последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты включена в ту же молекулу нуклеиновой кислоты, что и первая последовательность нуклеиновой кислоты, или вторая последовательность нуклеиновой кислоты, или первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 1-29 IL-15. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 1-29 SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15, может содержать последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1246. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 30-

162 IL-15. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 30-162 SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15, может содержать последовательность, кодирующую любую из последовательностей, перечисленных в таблице 11, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15, может содержать последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1242. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 секретируется при экспрессии в Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 1-162 IL-15. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 1-162 SEQ ID NO: 1245. В некоторых вариантах осуществления третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15, может содержать последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1246 и последовательность SEQ ID NO: 1242.

[689] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, описанный в данном документе, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PD-1 или его фрагмент, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CD28 или его фрагмент, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность, кодирующую сигнальный пептид CSF2RA. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1234. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность, кодирующую CD3 $\epsilon$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1235. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1, или ее фрагмент содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1 или его фрагмент, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую



нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1246. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 30-162 IL-15. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из последовательностей, перечисленных в таблице 11, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1242. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1 или его фрагмент, функционально связаны линкером T2A. В некоторых вариантах осуществления линкер T2A может содержать последовательность SEQ ID NO: 1238. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15, или ее фрагмент функционально связаны линкером P2A. В некоторых вариантах осуществления линкер P2A может содержать последовательность SEQ ID NO: 1261.

[690] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, описанный в данном документе, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PD-1 или его фрагмент, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид CD28 или его фрагмент, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность, кодирующую сигнальный пептид CSF2RA. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1234. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность, кодирующую CD3 $\epsilon$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1235. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1, или ее фрагмент содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1 или его фрагмент, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из последовательностей, перечисленных в таблице 10, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1, или ее фрагмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1256. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1, или ее фрагмент содержит последовательность, кодирующую N-петлю PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1, или ее фрагмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1257. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1, или ее фрагмент содержит последовательность, кодирующую IgV PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1, или ее фрагмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1258. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1, или ее фрагмент содержит последовательность, кодирующую стеблевую область PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1, или ее фрагмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1259. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1, или ее фрагмент содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1, или ее фрагмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1239. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид CD28 или его фрагмент, содержит последовательность, кодирующую внутриклеточный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1, или ее фрагмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1260. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, содержит последовательность, кодирующую аминокислоты 229-267 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1248. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PD-1 или его фрагмент, функционально связаны линкером T2A. В некоторых вариантах осуществления линкер T2A может содержать последовательность SEQ ID NO: 1238.

[691] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны

молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, описанный в данном документе, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IL-15 или его фрагмент, описанный в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность, кодирующую сигнальный пептид CSF2RA. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1234. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность, кодирующую CD3 $\epsilon$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1235. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, содержит последовательность, кодирующую аминокислоты 1-29 IL-15. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1246. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 30-162 IL-15. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из последовательностей, перечисленных в таблице 11, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1242. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, содержит последовательность, кодирующую аминокислоты 21-205 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1249. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, функционально связаны линкером T2A. В некоторых вариантах осуществления линкер T2A может содержать последовательность SEQ ID NO: 1238. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-15R $\alpha$  или его

фрагмент, функционально связаны нерасщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер может содержать последовательность SEQ ID NO: 1243.

[692] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, описанный в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IL-15 или его фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность, кодирующую сигнальный пептид CSF2RA. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1234. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность, кодирующую CD3ε. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1235. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, содержит последовательность, кодирующую аминокислоты 1-29 IL-15. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1246. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 30-162 IL-15. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из последовательностей, перечисленных в таблице 11, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1242. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, функционально связаны линкером T2A. В некоторых вариантах осуществления линкер T2A может содержать последовательность SEQ ID NO: 1238.

[693] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, описанный в данном документе, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IL-15 или его фрагмент, описанный в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующую IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность, кодирующую сигнальный пептид CSF2RA. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1234. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность, кодирующую CD3 $\epsilon$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1235. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, содержит последовательность, кодирующую аминокислоты 1-29 IL-15. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1246. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность, кодирующую аминокислоты 30-162 IL-15. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из последовательностей, перечисленных в таблице 11, или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1242. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, содержит последовательность, кодирующую аминокислоты 31-95 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1250. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, содержит последовательность, кодирующую аминокислоты 96-267 IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 1251. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TFP, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид IL-15 или его фрагмент, функционально связаны линкером T2A. В некоторых вариантах осуществления линкер T2A может содержать последовательность SEQ ID NO: 1238. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая

полипептид IL-15 или его фрагмент, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, функционально связаны нерасщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер может содержать последовательность SEQ ID NO: 1243.

[694] В некоторых вариантах осуществления молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанные в данном документе, дополнительно содержат лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из ДНК и РНК. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты представляет собой кРНК. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит аналог нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеиновой кислоты не находится в кодирующей последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеиновой кислоты выбран из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропила, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор, 2'-О-аминопропила (2'-О-АP), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-DMAEOE), модифицированного 2'-О-N-метилацетамидо (2'-О-NMA), закрытой нуклеиновой кислоты (ЗНК), этиленнуклеиновой кислоты (ЭНК), пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК), 1',5'-ангидрогекситоловой нуклеиновой кислоты (АНК), морфолино, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор N3-P5'-фосфорамидита. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты дополнительно содержит лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промоторную последовательность. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую поли(А)-хвост. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность 3'UTR. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту или неприродную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой транскрибируемую *in vitro* нуклеиновую кислоту.

[695] Настоящее изобретение дополнительно относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, описанный в данном документе, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанный в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$ , или его фрагмент, описанный в данном документе. В одном аспекте вектор, кодирующий TFP, описанный в данном документе, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные

в данном документе, можно непосредственно трансдуцировать в клетку, например, Т-клетку. В одном аспекте вектор представляет собой вектор клонирования или экспрессии, например вектор, включающий, но не ограничивающийся, одной или более плазмидами (например, плазмидами экспрессии, векторами клонирования, мини-кольцами, минивекторами, двойными микрохромосомами), ретровирусной и лентивирусной векторной конструкцией. В одном аспекте вектор способен экспрессировать конструкцию TFP, конструкцию IL-15 и/или конструкцию IL-15R $\alpha$  в Т-клетках млекопитающих. В одном аспекте Т-клетка млекопитающего является Т-клеткой человека.

[696] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе, содержит последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, перечисленных в таблице 12. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе, содержит последовательность, кодирующую любую из аминокислотных последовательностей, перечисленных в таблице 12. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе, содержит последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 1233, 1236, 1240 и 1264. В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе, содержит последовательность, кодирующую любую из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 1233, 1236, 1240 и 1264.

#### Векторы

[697] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к векторам, содержащим рекомбинантную нуклеиновую кислоту(-ы), кодирующую TFP и/или дополнительные представляющие интерес молекулы (например, белок или белки, которые должны секретироваться TFP-Т-клеткой). В некоторых случаях вектор выбрано из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), вектора на основе вируса саркомы Рауса (RSV) или ретровирусного вектора. В некоторых случаях вектор представляет собой вектор AAV6. В некоторых случаях вектор дополнительно содержит промотор. В некоторых случаях вектор представляет собой транскрибированный *in vitro* вектор.

[698] Последовательности нуклеиновой кислоты, ориентированные на желаемые молекулы, могут быть получены с помощью рекомбинантных способов, известных в данной области техники, как, например, путем скрининга библиотек из клеток, экспрессирующих ген, путем получения гена из вектора, известного как содержащего этот

ген, или путем непосредственного выделения из клеток и тканей, содержащих его, используя стандартные методики. Альтернативно, представляющий интерес ген может быть получен синтетическим путем, а не клонированием.

[699] Настоящее изобретение также обеспечивает векторы, в которые встроена ДНК по настоящему изобретению. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долговременного переноса гена, поскольку они обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом перед векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкоза мышей, в том отношении, что они могут трансдуцировать неразмножающиеся клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенности.

[700] В еще одном варианте осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую требуемый TFP по настоящему изобретению, представляет собой аденовирусный вектор (A5/35). В другом варианте осуществления экспрессия нуклеиновых кислот, кодирующих TFP, может быть осуществлена с помощью транспозонов, таких как «спящая красавица», «крипер», CAS9 и нуклеаза с цинковыми пальцами. См., например, June et al., 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716, который включен в данный документ посредством ссылки.

[701] TFP по настоящему изобретению можно использовать в мультицистронных векторах или векторах, экспрессирующих несколько белков в одной и той же транскрипционной единице. В таких векторах могут использоваться внутренние сайты посадки рибосом (IRES). Поскольку IRES функционируют не у всех хозяев и не обеспечивают стехиометрической экспрессии нескольких белков, вместо них можно использовать саморасщепляющиеся пептиды. Например, несколько вирусных пептидов расщепляются во время трансляции, что позволяет экспрессировать несколько белков, образующих единую транскрипционную единицу. Такие пептиды включают 2A-пептиды или 2A-подобные последовательности представителей семейства вирусов Picornaviridae. См., например, Szymczak et al., 2004, Nature Biotechnology; 22:589-594. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, кодирует TFP в рамке считывания с агентом, причем две последовательности разделены саморасщепляющимся пептидом, таким как последовательность 2A или последовательность T2A.

[702] Конструкции экспрессии по настоящему изобретению также могут использоваться для иммунизации нуклеиновой кислотой и генной терапии, используя стандартные протоколы доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области техники (см., например, патенты США №№ 5399346, 5580859, 5589466, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки). В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к вектору для генной терапии.

[703] Нуклеиновая кислота может быть клонирована в целый ряд типов векторов.

Например, нуклеиновая кислота может быть клонирована в вектор, включая, помимо прочего, плазмиду, фагмид, производное фага, вирус животного и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы генерации зондов и векторы секвенирования.

[704] Более того, вектор экспрессии можно доставлять в клетку в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook et al., 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), и других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые можно использовать в качестве векторов, включают, помимо прочего, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Как правило, подходящий вектор содержит точку начала репликации, функционирующую по меньшей мере в одном организме, последовательность промотора, удобные сайты рестрикционных эндонуклеаз и один или более выбираемых маркеров, (например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6326193).

[705] Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан ряд вирусных систем. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген можно встроить в вектор и упаковать в ретровирусные частицы с использованием способов, известных в данной области техники. Затем рекомбинантный вирус можно выделить и доставить в клетки субъекта либо *in vivo*, либо *ex vivo*. В данной области техники известен ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления используют аденовирусные векторы. В данной области известен ряд аденовирусных векторов. В одном варианте осуществления используются лентивирусные векторы.

[706] Дополнительные элементы промотора, например энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области на 30-110 п. о. выше сайта начала, хотя было продемонстрировано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже сайта начала. Часто интервал между элементами промотора является гибким, таким образом, промоторная функция сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (ТК) интервал между элементами промотора можно увеличить до 50 п. о., прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо для активации транскрипции.

[707] Примером промотора, способного к экспрессии трансгена TFP в Т-клетке млекопитающего, является промотор EF1a. Нативный промотор EF1a стимулирует экспрессию альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации-1, который отвечает за ферментную доставку аминоксил-тРНК в рибосому. Промотор EF1a широко использовался в экспрессионных плаزمидях млекопитающих, и было показано, что он эффективен в управлении экспрессией TFP из трансгенов, клонированных в

лентивирусный вектор (см., например, Milone et al., *Mol. Ther.* 17(8): 1453-1464 (2009)). Другим примером промотора является последовательность немедленно раннего промотора цитомегаловируса (CMV). Эта последовательность промотора является последовательностью сильного конститутивного промотора, способной стимулировать высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально с ней связанной. Однако могут также использоваться и другие последовательности конститутивного промотора, включая, помимо прочего, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинных концевых повторов (ДКП) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно ранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы человеческого гена, такие как, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина, промотор фактора элонгации-1 $\alpha$ , промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Кроме того, настоящее изобретение не должно ограничиваться использованием конститутивных промоторов. В рамках настоящего изобретения также предусмотрены индуцируемые промоторы. Использование индуцируемого промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда такая экспрессия желательна или выключать экспрессию, когда экспрессия нежелательна. Примеры индуцируемых промоторов включают, помимо прочего, промотор металлотинина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона и промотор, регулируемый тетрациклином.

[708] Чтобы оценить экспрессию полипептида TFP или его частей, вектор экспрессии, вводимый в клетку, может также содержать выбираемый маркерный ген, репортерный ген или и тот, и другой, чтобы способствовать идентификации и выбору экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые необходимо подвергнуть трансфекции или инфицировать вирусными векторами. В других аспектах селективный маркер может переноситься отдельным участком ДНК и использоваться в процедуре совместной трансфекции. Как селективные маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями, чтобы обеспечить экспрессию в клетке-хозяине. К пригодным для использования селективным маркерам относятся, например, устойчивые к антибиотикам гены, такие как нео и т. п.

[709] Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В целом, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется в реципиентном организме или ткани и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется каким-либо легко определяемым свойством, например, ферментной активностью. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в реципиентные клетки. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие люциферазу, бета-

галактозидазу, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены, используя известные методики, или приобретены на коммерческой основе. В целом, конструкция с минимальным 5' фланкирующим участком, демонстрирующая самый высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируется как промотор. Такие промоторные области могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки способности веществ модулировать активированную промотором транскрипцию.

[710] В данной области техники известны способы введения и экспрессии генов в клетке. В контексте вектора экспрессии этот вектор можно легко ввести в клетку-хозяина, например, в клетку млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомого, любым способом, известным в данной области техники. Например, вектор экспрессии можно переносить в клетку-хозяин с помощью физических, химических или биологических средств.

[711] К физическим способам введения полинуклеотида в клетку-хозяин относятся осаждение фосфатом кальция, липофекция, бомбардировка частицами, микроинъекция, электропорация и т. п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al., 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Предпочтительным способом введения полинуклеотида в клетку-хозяин является трансфекция фосфатом кальция

[712] К биологическим способам введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяин относится использование векторов ДНК и РНК. Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом переноса генов в клетки млекопитающих, например клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т.п. (см., например, патенты США №№ 5350674 и 5585362).

[713] К химическим способам введения полинуклеотида в клетку-хозяина относятся системы коллоидной дисперсии, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, частицы, и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Примером коллоидной системы, используемой в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo*, является липосома (например, искусственная мембранная везикула). Доступны другие способы направленной доставки нуклеиновых кислот существующего уровня техники, такие как доставка полинуклеотидов с нацеленными наночастицами или другая подходящая система доставки субмикронных элементов.

[714] В случае использования невирусной системы доставки примером средства доставки является липосома. Предусмотрено использование липидных составов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяин (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом

аспекте изобретения нуклеиновая кислота может быть связана с липидом. Нуклеиновая кислота, связанная с липидом, может быть инкапсулирована в водном внутреннем пространстве липосомы, рассеяна по липидному бислою липосомы, присоединена к липосоме посредством линкерной молекулы, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, заключена в липосоме, связана в комплекс с липосомой, диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, объединена с липидом, может содержаться в виде суспензии в липиде, содержатся или быть связана в комплекс с мицеллой или любым другим образом связана с липидом. Композиции, связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/вектором экспрессии, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в бислоистой структуре, такой как мицеллы, или иметь «разрушенную» структуру. Также они могут быть просто рассеяны в растворе, предположительно образуя агрегаты, не имеющие одинаковых размера или формы. Липиды представляют собой жиры, которые могут быть природными или синтетическими липидами. Например, липиды включают жирные капли, которые естественным образом встречаются в цитоплазме, а также класс соединений, содержащих длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминоспирты и альдегиды.

[715] Подходящие для использования липиды можно получить из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин («DMPC») можно получить от компании Sigma, Сент-Луис, штат Миссури; дицетилфосфат («DCP») можно получить от компании K & K Laboratories (Плейнвью, штат Нью-Йорк); холестерин («Choi») можно получить от компании Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин («DMPG») и другие липиды можно получить от компании Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, штат Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить при температуре около  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Хлороформ используется как единственный растворитель, так как он испаряется легче, чем метанол. Термин «липосома» в контексте настоящего описания представляет собой общий термин, охватывающий множество одно- и многослойных липидных носителей, образованных путем образования замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать, как содержащие везикулярные структуры с фосфолипидной бислоистой мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы содержат много липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоорганизации перед образованием замкнутых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5: 505-10). Однако также охватываются композиции, которые имеют структуру в растворе, отличную от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут принимать мицеллярную структуру или существовать только в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также предусмотрены комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

[716] Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иным образом подвергания клетки воздействию ингибитора по настоящему изобретению, с целью подтверждения наличия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине можно проводить ряд анализов. Такие анализы включают, например, «молекулярно-биологические» анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как выявление наличия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими способами (ELISA и вестерн-блоттинг) или путем анализов, описываемых в данном документе, для идентификации веществ, входящих в объем настоящего изобретения.

[717] Настоящее изобретение дополнительно относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP. В одном аспекте вектор TFP можно непосредственно трансдуцировать в клетку, например, Т-клетку. В одном аспекте вектор представляет собой вектор клонирования или экспрессии, например вектор, включающий, но не ограничивающийся, одной или более плазмидами (например, плазмидами экспрессии, векторами клонирования, мини-кольцами, минивекторами, двойными микрохромосомами), ретровирусной и лентивирусной векторной конструкцией. В одном аспекте вектор способен экспрессировать конструкцию TFP в Т-клетках млекопитающих. В одном аспекте Т-клетка млекопитающего является Т-клеткой человека.

[718] В некоторых вариантах осуществления конструкции TFP находятся в векторе, который дополнительно содержит последовательность, кодирующую пептид IL-15 или пептид IL-15R $\alpha$ . IL-15 может быть закодирован в той же открытой рамке считывания и разделен саморасщепляющимся пептидом (например, саморасщепляющимся пептидом P2A или T2A). В некоторых вариантах осуществления пептид IL-15 содержит секретрируемый IL-15. Секретрируемый IL-15 может иметь последовательность SEQ ID NO: 1242. В некоторых вариантах осуществления пептид IL-15 представляет собой слитую молекулу IL-15-IL15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления IL-15R $\alpha$  содержит последовательность SEQ ID NO: 1251 или SEQ ID NO: 1247. В некоторых вариантах осуществления слитая молекула IL-15-IL15R $\alpha$  содержит линкер, за которым следует домен Sushi, связывающий IL-15 и IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления слитая молекула IL-15-IL15R $\alpha$  содержит последовательность SEQ ID NO: 1253. В некоторых вариантах осуществления пептид IL-15R $\alpha$  содержит внеклеточный и трансмембранный домен PD-1. Внеклеточный и трансмембранный домен PD-1 можно слить с внутриклеточным доменом CD28. Пептид IL-15R $\alpha$  может дополнительно содержать внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$ , слитый с С-концом CD28 (например, внутриклеточным доменом CD28). В некоторых вариантах осуществления слитая молекула PD-1-CD28-IL-15R $\alpha$  содержит последовательность SEQ ID NO: 1254. В некоторых вариантах осуществления вектор дополнительно содержит последовательность, кодирующую слитый белок PD-1-CD28. Слитый белок может иметь трансмембранный домен PD-1. В некоторых вариантах осуществления слитый белок PD-1-CD28 содержит

последовательность SEQ ID NO: 1244.

#### Кольцевая РНК

[719] В некоторых вариантах осуществления TFP-T-клетки трансдуцируют молекулой РНК. В некоторых вариантах осуществления РНК представляет собой кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления кольцевая РНК является экзогенной. В других вариантах осуществления кольцевая РНК является эндогенной. В других вариантах осуществления кольцевые РНК с внутренним сайтом посадки рибосомы (IRES) можно транслировать *in vitro* или *in vivo*, или *ex vivo*.

[720] Кольцевые РНК представляют собой класс одноцепочечных РНК с непрерывной структурой, имеющей повышенную стабильность и отсутствие концевых мотивов, необходимых для взаимодействия с различными клеточными белками. Кольцевые РНК представляют собой 3-5' ковалентно замкнутые кольца РНК, а кольцевые РНК не имеют кэп- или поли(А)-хвостов. Поскольку у кольцевых РНК отсутствуют свободные концы, необходимые для опосредованной экзонуклеазой деградации, это делает их устойчивыми к нескольким механизмам оборота РНК и увеличивает продолжительность жизни по сравнению с их линейными аналогами мРНК. По этой причине циркуляризация может позволить стабилизировать мРНК, которые обычно страдают коротким периодом полужизни, и, следовательно, может повысить общую эффективность мРНК в различных применениях. Кольцевые РНК образуются в процессе сплайсинга, а циркуляризация происходит с использованием обычных сайтов сплайсинга, в основном на границах аннотированных экзонов (Starke et al., 2015; Szabo et al., 2015). Для циркуляризации сайты сплайсинга используются в обратном порядке: расположенные по ходу транскрипции доноры сплайсинга «соединяются» с расположенными против хода транскрипции акцепторами сплайсинга (см. обзор Jeck and Sharpless, 2014; Barrett and Salzman, 2016; Szabo and Salzman, 2016; Holdt et al., 2018).

[721] Чтобы генерировать кольцевые РНК, которые мы могли бы впоследствии перенести в клетки, можно запрограммировать получение кольцевых РНК *in vitro* с вырезаемыми с помощью автокаталитического сплайсинга интронами. Метод получения кольцевой РНК может включать транскрипцию *in vitro* (IVT) матрицы линейной РНК-предшественника со специально разработанными праймерами. До сих пор сообщалось о трех основных стратегиях циркуляризации РНК: химические методы с использованием бромистого циана или аналогичного конденсирующего агента, ферментативные методы с использованием РНК или ДНК-лигаз и рибозимные методы с использованием саморасщепляющихся интронов. В предпочтительных вариантах осуществления РНК-предшественник синтезировали с помощью прерванной транскрипции, а затем нагревали в присутствии ионов магния и GTP для ускорения циркуляризации. Полученная таким образом РНК может эффективно трансфицировать различные типы клеток. В одном аспекте матрица включает последовательности TFP, CAR и TCR или их комбинацию.

[722] Хорошо известно, что интрон группы I гена тимидилат синтазы (td) фага T4 становится кольцевым, в то время как экзоны сплайсируются линейно (Chandry and Bel-

fort, 1987; Ford and Ares, 1994; Perriman and Ares, 1998). Когда порядок интрона *td* изменяется, фланкируя какую-либо последовательность экзона, экзон становится кольцевым посредством двух автокаталитических реакций переэтерификации (Ford and Ares, 1994; Puttaraju and Been, 1995). В предпочтительных вариантах осуществления интрон группы I гена тимидилатсинтазы (*td*) фага T4 используют для получения экзогенной кольцевой РНК.

[723] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления был использован рибозимный метод с использованием пермутированного каталитического интрона группы I, поскольку он более применим для циркуляризации длинных РНК и требует только добавления GTP и  $Mg^{2+}$  в качестве кофакторов. Эта стратегия сплайсинга пермутированных интрон-экзонных последовательностей (PIE) состоит из слитых частичных экзонов, окруженных последовательностями половин интронов. *In vitro* эти конструкции подвергаются реакциям двойной переэтерификации, характерным для каталитических интронов группы I, но поскольку экзоны сливаются, они вырезаются в виде ковалентно связанных 5'-3'-связанных колец.

[724] В одном аспекте в данном документе описана последовательность, содержащая IRES полноразмерного вируса энцефаломиокардита (такого как EMCV), ген, кодирующий TFP, CAR, TCR или их комбинацию, две короткие области, соответствующие фрагментам экзона (E1 и E2), и конструкции PIE между 3'- и 5'-интронами пермутированного каталитического интрона группы I в гене тимидилатсинтазы (Td) фага T4 или пермутированного каталитического интрона группы I в гене пре-тРНК *Anabaena*. В более предпочтительных вариантах осуществления указанная последовательность дополнительно содержит комплементарные «плечи гомологии», расположенные на 5'- и 3'-концах РНК-предшественника с целью сближения 5'- и 3'-сайтов сплайсинга друг с другом. Чтобы убедиться, что основной продукт сплайсинга был кольцевым, реакционную смесь для сплайсинга можно обработать РНКазой R.

[725] В одном аспекте TFP к CD70 кодируется кольцевой РНК. В одном аспекте кольцевую РНК, кодирующую TFP к CD70, вводят в Т-клетку для получения TFP-Т-клетки. В одном варианте осуществления транскрибированная *in vitro* РНК TFP может вводиться в клетку с помощью транзientной трансфекции.

[726] В некоторых аспектах линейную РНК-предшественник продуцируют путем транскрипции *in vitro* с использованием матрицы, генерируемой полимеразной цепной реакцией (ПЦР), как описано в данном документе.

[727] Дополнительную информацию о TFP-Т-клетках, полученных указанными выше способами, см. в одновременно находящейся на рассмотрении предварительной заявке с серийным номером 62/836977, которая включена в данный документ посредством ссылки.

#### Модифицированные Т-клетки

[728] В данном документе описаны модифицированные Т-клетки, содержащие

последовательность, кодирующую TFP, из нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, или TFP, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны модифицированные аллогенные Т-клетки, содержащие последовательность, кодирующую TFP, описанную в данном документе, или TFP, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе.

[729] В некоторых вариантах осуществления модифицированные Т-клетки, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе, или векторы, описанные в данном документе, имеют функциональное нарушение эндогенного TCR. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны модифицированные аллогенные Т-клетки, содержащие последовательность, кодирующую TFP, описанную в данном документе, или TFP, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе.

[730] В некоторых случаях Т-клетка дополнительно содержит гетерологичную последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR-альфа, константный домен TCR-бета или константный домен TCR-альфа и константный домен TCR-бета. В некоторых случаях эндогенный TCR, который функционально нарушен, представляет собой альфа-цепь эндогенного TCR, бета-цепь эндогенного TCR или альфа-цепь эндогенного TCR и бета-цепь эндогенного TCR. В некоторых случаях Т-клетка дополнительно содержит гетерологичную последовательность, кодирующую константный домен TCR, где константный домен TCR представляет собой константный домен TCR-гамма, константный домен TCR-дельта или константный домен TCR-гамма и константный домен TCR-дельта. В некоторых случаях эндогенный TCR, который функционально нарушен, представляет собой гамма-цепь эндогенного TCR, дельта-цепь эндогенного TCR или гамма-цепь эндогенного TCR и дельта-цепь эндогенного TCR. В некоторых случаях эндогенный TCR, который функционально нарушен, имеет сниженное связывание с комплексом МНС-пептид по сравнению со связыванием немодифицированной контрольной Т-клетки. В некоторых случаях функциональное нарушение представляет собой нарушение гена, кодирующего эндогенный TCR. В некоторых случаях нарушение гена, кодирующего эндогенный TCR, представляет собой удаление последовательности гена, кодирующего эндогенный TCR, из генома Т-клетки. В некоторых случаях Т-клетка представляет собой человеческую Т-клетку. В некоторых случаях Т-клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Т-клетку. В некоторых случаях Т-клетка представляет собой аллогенную Т-клетку. В некоторых случаях Т-клетка представляет собой Т-клетку с альфа-бета-TCR. В некоторых случаях Т-клетка представляет собой Т-клетку с гамма-дельта-TCR. В некоторых случаях один или более из TCR-альфа, TCR-бета, TCR-гамма и TCR-дельта были модифицированы для получения аллогенной Т-клетки. См., например, одновременно находящуюся на рассмотрении публикацию РСТ № WO 2019173693, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[731] В некоторых вариантах осуществления модифицированные Т-клетки представляют собой  $\gamma\delta$ -Т-клетки и не имеют функциональное нарушение эндогенного TCR. В некоторых вариантах осуществления  $\gamma\delta$  Т-клетки представляют собой V $\delta$ 1+ V $\delta$ 2- $\gamma\delta$  Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления  $\gamma\delta$  Т-клетки представляют собой V $\delta$ 1- V $\delta$ 2+  $\gamma\delta$  Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления  $\gamma\delta$  Т-клетки представляют собой V $\delta$ 1- V $\delta$ 2-  $\gamma\delta$  Т-клетки.

[732] В некоторых случаях модифицированные Т-клетки дополнительно содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанную со вторым полипептидом, содержащим положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена. В некоторых случаях ингибирующая молекула содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

[733] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны клетки, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе, полипептид, описанный в данном документе, или векторы, описанные в данном документе, где клетки содержат последовательность, кодирующую TFP, описанный в данном документе, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL-15 или его фрагмент секретируется при экспрессии в клетке. Например, описанные в данном документе клетки могут секретировать полипептид IL-15, экспрессируемый рекомбинантными молекулами нуклеиновых кислот, описанными в данном документе, в ответ на агент активации клеток. В некоторых вариантах осуществления сигналинг IL-15 усиливается в ответ на агент активации клеток. В некоторых вариантах осуществления агент для активации клеток включает агент активации Т-клеток. Агент активации Т-клеток, как описано в данном документе, может включать, но не ограничиваться ими, антитело к CD3 или его фрагмент, антитело к CD28 или его фрагмент, цитокин, антиген, который связывается с антигенсвязывающим доменом TFP, описанный в данном документе, или любые их комбинации.

[734] В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, клетки, содержащие описанную в данном документе последовательность, кодирующую TFP, полипептид IL-15 или его фрагмент, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе, могут иметь повышенную выживаемость, усиленную эффекторную функцию и /или повышенную цитотоксичность по сравнению с клетками, не содержащими последовательность, кодирующую TFP, описанные в данном документе, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка имеет повышенную выживаемость по сравнению с клеткой, не имеющей сигналинга IL-15. В некоторых вариантах осуществления клетка имеет

повышенную выживаемость по сравнению с клеткой, которая не экспрессирует полипептид IL-15 или его фрагмент и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления клетка имеет усиленную эффекторную функцию по сравнению с клеткой, не имеющей сигналинга IL-15. В некоторых вариантах осуществления клетка имеет усиленную эффекторную функцию по сравнению с клеткой, которая не экспрессирует полипептид IL-15 или его фрагмент и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления клетка имеет повышенную цитотоксичность по сравнению с клеткой, не имеющей сигналинга IL-15. В некоторых вариантах осуществления клетка имеет повышенную цитотоксичность по сравнению с клеткой, которая не экспрессирует полипептид IL-15 или его фрагмент и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент.

[735] В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, клетки, содержащие описанную в данном документе последовательность, кодирующую TFP, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе, могут иметь повышенную продолжительность жизни по сравнению с клетками, которые не содержат последовательность, кодирующую описанный в данном документе TFP, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления продолжительность жизни клетки увеличивается по сравнению с клеткой, которая не содержит (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент, или (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид альфа-рецептора интерлейкина-15 (IL-15R $\alpha$ ) или его фрагмент.

[736] В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, клетки, содержащие описанную в данном документе последовательность, кодирующую TFP, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе, могут иметь повышенную стойкость по сравнению с клетками, которые не содержат последовательность, кодирующую описанный в данном документе TFP, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления стойкость клетки увеличивается по сравнению с клеткой, которая не содержит (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент, или (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид альфа-рецептора интерлейкина-15 (IL-15R $\alpha$ ) или его фрагмент.

[737] В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, клетки, содержащие описанную в данном документе последовательность, кодирующую TFP, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе, могут иметь

повышенную цитотоксичность по сравнению с клетками, которые не содержат последовательность, кодирующую описанный в данном документе TFP, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления цитотоксичность клетки увеличивается по сравнению с клеткой, которая не содержит (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент, или (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид альфа-рецептора интерлейкина-15 (IL-15R $\alpha$ ) или его фрагмент.

[738] В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, клетки, содержащие описанную в данном документе последовательность, кодирующую TFP, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе, могут иметь повышенную продукцию цитокинов по сравнению с клетками, которые не содержат последовательность, кодирующую описанный в данном документе TFP, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления продукция цитокинов клетки увеличивается по сравнению с клеткой, которая не содержит (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент, или (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид альфа-рецептора интерлейкина-15 (IL-15R $\alpha$ ) или его фрагмент.

[739] В некоторых вариантах осуществления клетки, описанные в данном документе, сохраняют наивный фенотип памяти и/или фенотип центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки не дифференцировались в терминальные эффекторные клетки.

[740] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описана популяция клеток, включающая любую клетку, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описана популяция клеток, содержащая любую из клеток, описанных в данном документе, где популяция клеток имеет повышенную долю клеток, имеющих фенотип центральной памяти, по сравнению с популяцией клеток, которые не содержат последовательность, кодирующую TFP, описанный в данном документе, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток имеет повышенную долю клеток, имеющих фенотип центральной памяти, по сравнению с популяцией клеток, которые не содержат (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент или (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид альфа-рецептора интерлейкина-15 (IL-15R $\alpha$ ) или его фрагмент.

[741] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описана популяция клеток, содержащая любую из клеток, описанных в данном документе, где

популяция клеток имеет повышенную долю клеток, имеющих наивный фенотип, по сравнению с популяцией клеток, которые не содержат последовательность, кодирующую TFP, описанный в данном документе, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток имеет повышенную долю клеток, имеющих наивный фенотип, по сравнению с популяцией клеток, которые не содержат (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент, или (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид альфа-рецептора интерлейкина-15 (IL-15R $\alpha$ ) или его фрагмент.

[742] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описана популяция клеток, содержащая любую из клеток, описанных в данном документе, при этом популяция клеток имеет уменьшенную долю клеток, имеющих терминальный эффекторный фенотип, по сравнению с популяцией клеток, которые не содержат последовательность, кодирующую TFP, описанный в данном документе, полипептид IL-15 или его фрагмент, описанные в данном документе, и/или полипептид IL-15R $\alpha$  или его фрагмент, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток имеет уменьшенную долю клеток, имеющих терминальный эффекторный фенотип, по сравнению с популяцией клеток, которые не содержат (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент, или (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид альфа-рецептора интерлейкина-15 (IL-15R $\alpha$ ) или его фрагмент.

#### Источники Т-клеток

[743] Перед экспансией и генетической модификацией у субъекта получают источник Т-клеток. Термин «субъект» предназначен для включения живых организмов, у которых может быть вызван иммунный ответ (например, млекопитающие). К примерам субъектов относятся люди, собаки, кошки, мыши, крысы и их трансгенные виды. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, в том числе мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), костного мозга, ткани лимфатических узлов, пуповинной крови, ткани вилочковой железы, ткани области инфекции, асцита, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей. В некоторых вариантах Т-клетки могут быть получены из лейкопака. В определенных аспектах настоящего изобретения можно использовать любое количество линий Т-клеток, доступных в данной области техники. В некоторых аспектах настоящего изобретения Т-клетки могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта с использованием ряда методик, известных специалисту в данной области техники, таких как отделение Ficoll<sup>TM</sup>. В одном предпочтительном аспекте клетки из циркулирующей крови индивида получают посредством афереза. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные белые кровяные клетки, красные кровяные клетки и тромбоциты. В одном аспекте клетки, собранные посредством афереза, могут быть промыты для удаления

фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для дальнейших этапов обработки. В одном аспекте настоящего изобретения клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В альтернативном аспекте раствор для промывания не содержит кальций и может не содержать магний или может не содержать многие, если не все, двухвалентные катионы. Начальные этапы активации при отсутствии кальция могут привести к усиленной активации. Как будет понятно специалистам в данной области техники, этап промывания можно осуществить способами, известными специалистам в данной области техники, такими как с использованием полуавтоматической «проточной» центрифуги (например, клеточного процессора Cobe® 2991, Baxter Oncology CytoMate, или Haemonetics® Cell Saver® 5) в соответствии с инструкциями производителя. После промывания клетки могут быть повторно суспендированы в различных биосовместимых буферах, таких как, например, не содержащий Ca, не содержащий Mg PBS, PlasmaLyte A, или другом солевом растворе с буфером или без него. В альтернативном варианте нежелательные компоненты образца после афереза можно удалять, и непосредственно ресуспендировать клетки в культуральной среде.

[744] В вариантах осуществления Т-клетки представляют собой  $\alpha\beta$ -Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой  $\gamma\delta$ -Т-клетки.  $\gamma\delta$ -Т-клетки получают, например, из банка пуповинной крови, периферической крови, эмбриональных стволовых клеток человека или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

[745] В одном аспекте Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови посредством лизиса эритроцитов и деплеции моноцитов, например, посредством центрифугирования в градиенте PERCOLL® или проточного элютриационного центрифугирования. Специфическая субпопуляция Т-клеток, такая как CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+, CD45RO+, альфа-бета или гамма-дельта Т-клетки, может быть дополнительно выделена посредством методик положительной или отрицательной селекции. Например, в одном аспекте CD4+ и CD8+ Т-клетки выделяют с помощью микрочастиц с анти-CD4 и анти-CD8. В еще одном аспекте Т-клетки выделяют путем инкубации с частицами, конъюгированными с анти-CD3/анти-CD28, (например, 3×28), такими как DYNABEADS® М -450 CD3/CD28 Т или частицы Trans-Act®, в течение периода времени, достаточного для позитивной селекции желаемых Т-клеток. В одном аспекте период времени составляет около 30 минут. В дополнительном аспекте период времени находится в диапазоне от 30 минут до 36 часов или более для всех целых значений в этом диапазоне. В дополнительном аспекте период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В еще одном предпочтительном аспекте период времени составляет от 10 до 24 часов. В одном аспекте время инкубации составляет 24 часа. Большее время инкубации можно использовать для выделения Т-клеток в любой ситуации, когда Т-клеток меньше по сравнению с другими типами клеток, как при выделении проникающих в опухоль лимфоцитов (TIL) из опухолевой ткани или у

индивидов с иммунодефицитом. Более того, использование большего времени инкубации может повышать эффективность захвата CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Таким образом, простым уменьшением или увеличением времени связывания Т-клеток с частицами CD3/CD28 и/или увеличением или уменьшением соотношения частиц к Т-клеткам (как описано ниже в данном документе) можно предпочтительно проводить положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие моменты времени в течение процесса. Кроме того, повышая или понижая соотношение антител к CD3 и/или к CD28 на частицах или другой поверхности, можно предпочтительно проводить положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие желаемые моменты времени. Специалисту в данной области техники будет понятно, что в контексте настоящего изобретения также можно использовать многочисленные стадии селекции. В определенных аспектах может быть желательным проведение процедуры селекции и использование «неотобранных» клеток в процессе активации и экспансии. «Неотобранные» клетки также можно подвергать дополнительным этапам селекции.

[746] Обогащение популяции Т-клеток посредством негативного отбора можно осуществлять с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для негативно отбираемых клеток. Одним из методов является сортировка и/или отбор клеток с помощью негативной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии, в которых используется коктейль моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на негативно отбираемых клетках. Например, для обогащения в отношении CD4<sup>+</sup> клеток посредством негативного отбора коктейль моноклональных антител, как правило, включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В определенных аспектах может быть желательным обогащение или положительная селекция регуляторных Т-клеток, которые обычно экспрессируют CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD62Lhi, GITR<sup>+</sup> и FoxP3<sup>+</sup>. Альтернативно, в определенных аспектах регуляторные Т-клетки деплецируют посредством частиц, конъюгированных с антителом к CD25, или другим аналогичным способом селекции.

[747] В одном варианте осуществления можно выбрать такую популяцию Т-клеток, которая экспрессирует один или более из IFN- $\gamma$ , TNF-альфа, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, гранзима В и перфорина, или другие соответствующие молекулы, например, другие цитокины. Способы скрининга клеточной экспрессии можно определить, например, с помощью способов, описанных в публикации РСТ № WO2013126712, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[748] Для выделения желаемой популяции клеток посредством положительной или отрицательной селекции можно изменять концентрацию клеток и поверхность (например, частиц, таких как гранулы). В определенных аспектах может быть желательным существенное уменьшение объема, в котором гранулы и клетки смешивают друг с другом (например, увеличение концентрации клеток), для обеспечения максимального приведения в контакт клеток и частиц. Например, в одном аспекте используют

концентрацию 2 миллиарда клеток/мл. В одном аспекте используют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. В дополнительном аспекте используют концентрацию более чем 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном аспекте используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном аспекте используют концентрацию клеток от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных аспектах могут использовать концентрацию 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к увеличенному выходу клеток, активации клеток и экспансии клеток. Более того, использование высоких концентраций клеток обеспечивает более эффективный захват клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или из образцов, где содержится много опухолевых клеток (например, кровь больного лейкозом, опухолевая ткань и т. д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическое значение, и их получение является желательным. Например, использование высокой концентрации клеток обеспечивает более эффективную селекцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые обычно слабо экспрессируют CD28.

[749] В родственном аспекте может быть желательным использование более низких концентраций клеток. Значительным разведением смеси Т-клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы) сводят к минимуму взаимодействия между частицами и клетками. Это позволяет отбирать клетки, которые экспрессируют высокие количества желаемых антигенов, которые должны связываться с частицами. Например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки экспрессируют высокие уровни CD28, и их можно более эффективно захватывать по сравнению с CD8<sup>+</sup> Т-клетками в разведенных концентрациях. В одном аспекте используемая концентрация клеток составляет  $5 \times 10^6$ /мл. В других аспектах используемая концентрация может составлять от около  $1 \times 10^5$ /мл до  $1 \times 10^6$ /мл и любое целое значение в этом диапазоне. В других аспектах клетки можно инкубировать на ротационном шейкере в течение периодов времени различной продолжительности при различных скоростях при температуре 2-10°C или при комнатной температуре.

[750] Т-клетки для стимуляции также можно замораживать после этапа промывки. Не ограничиваясь теорией, стадия заморозки и последующей разморозки обеспечивает более однородный продукт за счет удаления гранулоцитов и, в некоторой степени, моноцитов из популяции клеток. После этапа промывки, который обеспечивает удаление плазмы и тромбоцитов, клетки можно суспендировать в замораживающем растворе. Несмотря на то, что многие замораживающие растворы и параметры известны в данной области техники и будут являться пригодными в этом контексте, один из способов включает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточного альбумина человека, или культуральной среды, содержащей 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO, или 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% декстрозы 5%, 0,45% NaCl, 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO, или других подходящих для замораживания клеток сред, содержащих, например, Hespán и PlasmaLyte A, затем клетки замораживают до -80°C

при скорости 1 в минуту и хранят в газовой фазе в резервуаре для хранения жидкого азота. Можно использовать другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемого замораживания непосредственно при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  или в жидком азоте. В определенных аспектах криоконсервированные клетки размораживают и промывают, как описано в данном документе, и оставляют отстаиваться в течение одного часа при комнатной температуре перед активацией способами по настоящему изобретению.

[751] В контексте настоящего изобретения также предусмотрен сбор образцов крови или продукта афереза у субъекта в течение периода времени перед тем, когда могут потребоваться размноженные клетки, как описано в данном документе. В связи с этим, источник клеток, подлежащих экспансии, можно собирать в любой необходимый момент времени, и желаемые клетки, такие как Т-клетки, можно выделять и замораживать для дальнейшего использования в терапии на основе Т-клеток для любого количества заболеваний или патологических состояний, для которых терапия на основе Т-клеток будет эффективной, таких как заболевания, описанные в данном документе. В одном аспекте образец крови или продукт афереза получают, как правило, у здорового субъекта. В определенных аспектах образец крови или продукт афереза получают, как правило, у здорового субъекта, который подвержен риску развития заболевания, но у которого еще не развилось заболевание, и представляющие интерес клетки выделяют и замораживают для дальнейшего использования. В определенных аспектах Т-клетки можно подвергать экспансии, замораживать и использовать позже. В определенных аспектах образцы собирают у пациента сразу же после диагностики конкретного заболевания, как описано в данном документе, но до начала какого-либо лечения. В дополнительном аспекте клетки выделяют из образца крови или продукта афереза у субъекта до начала проведения любого количества подходящих способов лечения, включая, помимо прочего, лечение средствами, такими как натализумаб, эфализумаб, противовирусные агенты, химиотерапию, облучение, иммунодепрессивные средства такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат и микофенолат, антитела или другие иммунодеструктивные агенты, такие как алемтузумаб, антитела к CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, такролимус, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, ромидепсин и облучение.

[752] В дополнительном аспекте настоящего изобретения Т-клетки получают у пациента непосредственно после лечения, в результате которого у субъекта остаются функциональные Т-клетки. В связи с этим наблюдалось, что после определенных вариантов лечения рака, в частности при лечении препаратами, которые повреждают иммунную систему, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты обычно должны восстанавливаться от лечения, качество получаемых Т-клеток может быть оптимальным или улучшенным в отношении их способности к экспансии *ex vivo*. Аналогичным образом, после манипуляций *ex vivo* с использованием способов, описываемых в данном документе, эти клетки могут находиться в предпочтительном состоянии для повышенного прививания и экспансии *in vivo*. Таким образом, в контексте

настоящего изобретения предусмотрен сбор клеток крови, включая Т-клетки, дендритные клетки или другие клетки гемопоэтической линии, во время этой фазы восстановления. Более того, в определенных аспектах можно использовать мобилизацию (например, мобилизацию с GM-CSF) и схемы симптоматического лечения для создания состояния у субъекта, при котором благоприятной является репопуляция, рециркуляция, регенерация и/или экспансия конкретных типов клеток, особенно в течение определенного временного окна после терапии. Иллюстративные типы клеток включают Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

#### Активация и экспансия Т-клеток

[753] Т-клетки могут быть активированы и размножены, как правило, с использованием способов, описанных, например, в патенте США №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041, и 7572631.

[754] Как правило, Т-клетки по настоящему изобретению можно подвергать экспансии путем приведения в контакт с поверхностью, содержащей прикрепленный к ней агент, который стимулирует ассоциированный с комплексом CD3/TCR сигнал, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток могут стимулироваться, как описано в данном документе, например, приведением в контакт с антителом к CD3, или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом к CD28, иммобилизованным на поверхности, или приведением в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с кальциевым ионофором. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывается со вспомогательной молекулой. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации CD4<sup>+</sup> Т-клеток, CD8<sup>+</sup> Т-клеток или CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток Т-клеток используют антитело к CD3 и антитело к CD28. Можно использовать примеры антитела к CD28, включающие 9.3, В-Т3, XR-CD28 (Diaclone, Безансон, Франция), как и другие способы, общеизвестные в данной области техники (Berg et al., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Naanen et al., *J. Exp. Med.* 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., *J. Immunol. Meth.* 227(1-2):53-63, 1999). В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют путем инкубации с частицами, конъюгированными с анти-CD3/анти-CD28, такими как частицы DYNABEADS<sup>®</sup> или Trans-Act<sup>®</sup>, в течение периода времени, достаточного для активации Т-клеток. В одном аспекте период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В еще одном предпочтительном аспекте период времени составляет от 10 до 24 часов, например, 24 часа. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируются путем стимуляции антителом к CD3 и антителом к CD28 в комбинации с цитокинами, которые объединяются общей гамма-цепью (например, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 и др.). В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируются путем стимуляции антителом к CD3 и антителом к CD28 в комбинации с

10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 100 ЕД/мл IL-2, IL-7, и/или IL-15. В некоторых вариантах осуществления клетки активируются в течение 24 часов. В некоторых вариантах осуществления после трансдукции клетки размножаются в присутствии антитела к CD3, антитела к CD28 в комбинации с теми же цитокинами. В некоторых вариантах осуществления клетки, активированные в присутствии антитела к CD3 и антитела к CD28 в комбинации с цитокинами, которые объединяются общей гамма-цепью, размножаются в присутствии тех же цитокинов в отсутствие антитела к CD3 и антитела к CD28 после трансдукции. В некоторых вариантах осуществления после трансдукции клетки размножаются в присутствии антитела к CD3, антитела к CD28 в комбинации с теми же цитокинами до первой стадии промывки, когда клетки субкультивируют в среде, содержащей цитокины, но не содержащей антитело к CD3 и антитело к CD28. В некоторых вариантах осуществления клетки пересевают каждые 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней. В некоторых вариантах осуществления клетки увеличены на 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 дней.

[755] Экспансию Т-клеток можно стимулировать золедроновой кислотой (Зомета), алендроновой кислотой (Фосамакс) или другими родственными бисфосфонатами в концентрациях 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 7,5, 10 или 100  $\mu\text{M}$  в присутствии питающих клеток (облученных раковых клеток, РВМС, искусственных антигенпрезентирующих клеток). Экспансия Т-клеток можно стимулировать изопентилпирофосфатом (IPP), (Е)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилпирофосфатом (НМВРР или НМВ-РР) или другими структурно родственными соединениями в концентрациях 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 7,5, 10 или 100  $\mu\text{M}$  в присутствии питающих клеток (облученных раковых клеток, РВМС, искусственных антигенпрезентирующих клеток). В некоторых вариантах осуществления экспансию Т-клеток можно стимулировать синтетическими фосфоантигенами (например, бромгидринпирофосфатом; BrHPP), 2МЗВ1 РР или 2-метил-3-бутенил-1-пирофосфатом в присутствии IL-2 в течение одной-двух недель. В некоторых вариантах осуществления экспансию Т-клеток можно стимулировать иммобилизованным антителом к TCR $\gamma\delta$  (например, пан-TCRY6) в присутствии IL-2, например, в течение около 14 дней. В некоторых вариантах осуществления экспансию Т-клеток можно стимулировать культурой с иммобилизованными антителами к CD3 (например, ОКТ3) в присутствии IL-2. В некоторых вариантах осуществления указанную выше культуру поддерживают в течение приблизительно семи дней до субкультивирования в растворимом анти-CD3 и IL-2.

[756] Т-клетки, которые подвергали стимуляции в течение разного времени, могут демонстрировать разные характеристики. Например, типичные продукты мононуклеарных клеток крови или продукты мононуклеарных клеток периферической крови после афереза содержат популяцию хелперных Т-клеток (ТН, CD4+), которая больше, чем популяция цитотоксических или супрессорных Т-клеток (ТС, CD8+). *Ex vivo* экспансия Т-клеток посредством стимуляции рецепторов CD3 и CD28 позволяет получать

популяцию Т-клеток, которая приблизительно до 8-9 дня состоит преимущественно из ТН-клеток, а приблизительно после 8-9 дня популяция Т-клеток содержит возрастающую популяцию ТС-клеток. Соответственно, в зависимости от цели лечения, предпочтительной может быть инфузия субъекту популяции Т-клеток, содержащей преимущественно ТН-клетки. Аналогично, если была выделена антиген-специфическая субпопуляция ТС-клеток, может быть полезно размножение этой субпопуляции до большего количества.

[757] Более того, в дополнение к маркерам CD4 и CD8 во время процесса экспансии клеток значительно изменяются другие фенотипические маркеры, но в значительной степени воспроизводимо. Таким образом, воспроизводимость обеспечивает возможность подбирать активированный продукт Т-клеток для конкретных целей.

[758] После создания TFP можно использовать различные анализы для оценки активности молекулы, такой как, помимо прочего, способность Т-клеток активировать и усиливать стимуляцию, а также противораковую активность в соответствующих моделях *in vitro* и на животных моделях. Анализы для оценки эффектов TFP описаны более подробно далее.

#### Предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP

[759] Учитывая, что CD70 экспрессируется Т-клетками, одним из возможных эффектов экспрессии TFP к CD70 может быть уничтожение других Т-клеток, например, Т-клеток, экспрессирующих TFP к CD70, в процессе производства, то есть фратрицид. Настоящее изобретение охватывает способ снижения или предотвращения фратрицида Т-клеток, экспрессирующих слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD70 (CD70-TFP). В некоторых вариантах осуществления предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает маскирование или блокирование CD70 на Т-клетках агентом, разрушающим CD70, например, антителом к CD70, до или вскоре после экспрессии CD70-TFP. В некоторых вариантах осуществления CD70 может быть замаскирован антителом к CD70, антителом к CD27 или растворимым CD27. В некоторых вариантах осуществления предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает снижение уровней CD70 на клеточной поверхности, например, путем нокаута гена CD70 в его локусе, ингибирования или снижения транскрипции, ингибирования или снижения трансляции, нацеливания на белок CD70 для деградации.

[760] Во многих вариантах осуществления антитело к CD70 или его фрагмент могут содержать мышиное антитело или его связывающий фрагмент, человеческое антитело или его связывающий фрагмент, гуманизированное антитело или его связывающий фрагмент, моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело и его связывающий или функциональный фрагмент, включая, помимо прочего, однодоменное антитело, такое как VH, VL и VHH из наноантитела, полученного из верблюдовых. Во многих вариантах осуществления антитело к CD70 или его фрагмент могут также содержать одноцепочечный фрагмент, такой как scFv или sdAb.

В некоторых вариантах осуществления sdAb представляет собой V<sub>HH</sub>. В других вариантах осуществления антитело к CD70 или его фрагмент могут содержать Fv, Fab, (Fab')<sub>2</sub> или бифункциональное (например, биспецифическое) гибридное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело включает любое из антител к CD70, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 включает любое из антител, описанных в таблицах 1-4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает антитело V<sub>HH</sub> 70-001, описанное в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело включает антитело C10, описанное в данном документе. Неограничивающие примеры антител к CD70 включают кузатузумаб (ARGX-110), ворсетузумаб, MDX-1411 и новые антитела к CD70, описанные в данном документе.

[761] Предотвращение фратрицида также может быть достигнуто путем объединения клетки или популяции клеток с агентом, связывающим CD27. Агент, который связывается с CD27, может блокировать CD27 в той же или соседней клетке. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD27 или его фрагмент вводят экзогенно в клетку и связываются с CD27 на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления экзогенное антитело к CD27 или его фрагмент вводят во время экспансии клеток *in vitro*.

[762] Во многих вариантах осуществления антитело к CD27 или его фрагмент могут содержать мышиное антитело или его связывающий фрагмент, человеческое антитело или его связывающий фрагмент, гуманизированное антитело или его связывающий фрагмент, моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело и его связывающий или функциональный фрагмент, включая, помимо прочего, однодоменное антитело, такое как V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub> и V<sub>HH</sub> из наноантитела, полученного из верблюдовых. Во многих вариантах осуществления антитело к CD27 или его фрагмент могут также содержать одноцепочечный фрагмент, такой как scFv или sdAb. В некоторых вариантах осуществления sdAb представляет собой V<sub>HH</sub>. В других вариантах осуществления антитело к CD27 или его фрагмент могут содержать Fv, Fab, (Fab')<sub>2</sub> или бифункциональное (например, биспецифическое) гибридное антитело.

[763] Предотвращение фратрицида также может быть достигнуто путем объединения клетки или популяции клеток с растворимым CD27. В некоторых вариантах осуществления растворимый CD27 поступает в клетку экзогенно и связывается с CD70 на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления экзогенный растворимый CD27 обеспечивается во время экспансии клетки *in vitro*. Считается, что обеспечение растворимого CD27 конкурирует с нативным CD27 за связывание с CD70.

[764] В некоторых аспектах в данном документе предложен способ получения клетки (например, Т-клетки), содержащей TFR к CD70, описанный в данной документе, или молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный в данном документе CD70-TFR. В некоторых вариантах осуществления способ включает (i) трансдукцию клетки рекомбинантной нуклеиновой кислотой или вектором, кодирующим

CD70-TFP, описанным в данном документе; и (ii) приведение клетки в контакт с агентом, нарушающим CD70, который связывается с CD70 на поверхности клетки (например, агентом, нарушающим CD70, например, антителом к CD70, антителом к CD27 или растворимым CD27). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 имеет большую аффинность к CD70, чем антитело или антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, например, человеческую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой человеческую CD8<sup>+</sup> Т-клетку или человеческую CD4<sup>+</sup> Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой человеческую  $\alpha\beta$  Т-клетку или человеческую  $\gamma\delta$  Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой человеческую НКТ-клетку.

[765] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт проводят до трансдукции. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт происходит за 1 день до трансдукции, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часа до трансдукции. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт проводят после трансдукции. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт проводят в течение 5 дней после трансдукции. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт происходит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часа после трансдукции. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт происходит через 1,0 день, 1,5 дня, 2,0 дня, 2,5 дня, 3,0 дня, 3,5 дня, 4,0 дня, 4,5 дня или 5,0 дней после трансдукции. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает субкультивирование клеток в среде, не содержащей агент, нарушающий CD70, CD70 (например, антитело к CD70, антитело к CD27 или растворимый CD27). В некоторых вариантах осуществления субкультивирование клеток включает субкультивирование клеток в среде, не содержащей агент, нарушающий CD70 CD70, через 4 или более дней после трансдукции, например, через 7 дней после трансдукции. В некоторых вариантах осуществления субкультивирование включает субкультивирование клеток в среде, не содержащей агент, нарушающий CD70, CD70 через 4,5 дня, 5 дней, 5,5 дней, 6 дней или 6,5 дней после трансдукции. В некоторых вариантах осуществления субкультивирование включает субкультивирование клеток в среде, не содержащей агент CD70, нарушающий CD70, через 7 дней после трансдукции.

[766] В некоторых вариантах осуществления активация и/или экспансия клетки происходит в присутствии антитела к CD3 или его фрагмента и/или антитела к CD28 или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают экспансии в присутствии антитела к CD70 или его фрагмента в течение 10 или более дней. В некоторых вариантах осуществления клетка активируется и/или размножается в

присутствии одного или более цитокинов, таких как ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15 и ИЛ-21, как более подробно описано ниже. В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают экспансии в присутствии антитела к CD70 или его фрагмента в течение 10 или более дней. В некоторых вариантах осуществления перед трансдукцией Т-клетки активируют в присутствии агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки трансдуцируют в присутствии агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки подвергают экспансии в присутствии агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют путем стимуляции антителом к CD3 и антителом к CD28 в присутствии агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента, и, необязательно, одного или более цитокинов, которые объединяются общей гамма-цепью (например, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-21, и др.). В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют путем стимуляции антителом к CD3 и антителом к CD28 в присутствии агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента, и, необязательно, одного или более цитокинов, которые объединяются общей гамма-цепью (например, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-21 и др.), а затем размножаются в присутствии агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента после трансдукции (например, с антителами к CD3/CD28 и необязательными цитокинами или без них) в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более дней. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют путем стимуляции антителом к CD3 и антителом к CD28 в присутствии агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента, и, необязательно, одного или более цитокинов, которые объединяются общей гамма-цепью (например, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-21 и др.), а затем размножаются в присутствии агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента после трансдукции (например, с антителами к CD3/CD28 и необязательными цитокинами или без них) в течение 1, 2, 3, 4, 5 или более дней с последующей экспансией в отсутствие агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента.

[767] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют путем стимуляции антителом к CD3 и антителом к CD28 в отсутствие агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента, и, необязательно, одного или более цитокинов, которые объединяются общей гамма-цепью (например, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-21 и др.), а затем размножаются в присутствии агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента после трансдукции (например, с антителами к CD3/CD28 и необязательными цитокинами или без них) в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более дней.

[768] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют путем стимуляции антителом к CD3 и антителом к CD28 в отсутствие агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента, и, необязательно, одного или более цитокинов, которые объединяются общей гамма-цепью (например, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15,

IL-21 и др.), а затем размножаются в присутствии агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента после трансдукции (например, с антителами к CD3/CD28 и необязательными цитокинами или без них) в течение 1, 2, 3, 4 или 5 или более дней с последующей экспансией в отсутствие агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента.

[769] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют путем стимуляции антителом к CD3 и антителом к CD28 в отсутствие агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента, и, необязательно, одного или более цитокинов, которые объединяются общей гамма-цепью (например, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 и др.), а затем размножаются в отсутствие агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента после трансдукции (например, с антителами к CD3/CD28 и необязательными цитокинами или без них) в течение 1, 2, 3, 4 или 5 или более дней с последующей экспансией в присутствии агента, нарушающего CD70, например, антитела к CD70 или его фрагмента в течение 1, 2, 3, 4 или 5 и более дней.

[770] В некоторых вариантах осуществления агент, нарушающий CD70, представляет собой антитело к CD70, и антитело к CD70 используется в концентрации 100 нМ-100 мкМ в способах, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 используется в концентрации 1-50 мкМ или 2-20 мкМ. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 используют в концентрации 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мМ.

[771] Также в данном документе рассматриваются внутриклеточные слитые белки к CD70 и способы их применения для предотвращения фратрицида. В некоторых вариантах осуществления снижение или предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает снижение экспрессии CD70 на клеточной поверхности на Т-клетках путем связывания CD70 внутри клеток. В некоторых вариантах осуществления CD70 удерживается внутри клеток путем экспрессии локализованного внутри клетки антитела к CD70 в Т-клетках, т. е. слитого белка, содержащего домен антитела к CD70 и домен внутриклеточной локализации. Любые антитела к CD70, известные в данной области техники, могут быть использованы в слитом белке. В некоторых вариантах осуществления домен внутриклеточной локализации представляет собой удерживающий в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) домен. Они прикрепляют конструкции к ЭР/Гольджи, предотвращая секрецию или мембранную экспрессию целевого белка.

[772] Удерживающий в ЭПР домен может быть любым доменом, который удерживает CD70 в пределах ЭР или аппарата Гольджи. Удерживающий домен может представлять собой целевой пептид. Целевой пептид представляет собой короткую пептидную цепь из 3-70 аминокислот, которая обеспечивает транспорт белка в конкретную область клетки, такую как ЭР или аппарат Гольджи, и/или удерживает белок в конкретной области. В данной области техники известны различные целевые пептиды.

[773] Удерживающий домен предпочтительно представляет собой

последовательность KDEL (SEQ ID NO: 777), мотив KKXX, мотив KXKXX, хвост аденовирусного белка E19, имеющий последовательность KYKSRRSFIDEKKMP (SEQ ID NO: 778), или фрагмент инвариантной цепи HLA, имеющий последовательность MHRRRSRSCR (SEQ ID NO: 779). Удерживающий домен предпочтительно является С-концевым по отношению к связывающему домену. Удерживающий домен может быть N-концевым по отношению к связывающему домену.

[774] KDEL представляет собой целевую пептидную последовательность в аминокислотной структуре белка, которая препятствует секреции белка из ЭР. Белок, имеющий последовательность KDEL, будет выводиться из аппарата Гольджи путем ретроградного транспорта в просвет ЭР. Последовательность KDEL может также направлять белки из других мест (таких как цитоплазма) в ЭР. Белки могут покидать ЭР только после отщепления последовательности KDEL. Таким образом, белок, находящийся в ЭР, останется в ЭР до тех пор, пока он содержит последовательность KDEL.

[775] Удерживающий в ЭПР домен может представлять собой мотив KKXX (Lys-Lys-xxx-xxx). KKXX представляет собой целевой пептидный мотив, который обычно расположен на С-конце аминокислотной структуры белка. KKXX отвечает за выведение белков мембраны ЭР из цис-отдела аппарата Гольджи путем обратного транспорта посредством взаимодействия с комплексом белков оболочки (COPI).

[776] Удерживающий домен может представлять собой С-концевой цитоплазматический хвост известного белка ЭР, такого как белок аденовируса E19. Например, связывающий домен может представлять собой хвост аденовирусного белка E19, имеющего последовательность KYKSRRSFIDEKKMP (SEQ ID NO: 778). Альтернативно, связывающий домен может представлять собой N-концевой фрагмент инвариантной цепи HLA, такой как фрагмент, имеющий последовательность MHRRRSRSCR (SEQ ID NO: 779). В некоторых вариантах осуществления удержание в ЭР включает последовательность любой из SEQ ID NO. 756-776.

[777] Иллюстративная последовательность удержания в ЭР

[778] AEKDEL (SEQ ID NO: 756)

[779] EQKLISEEDLKDEL (SEQ ID NO: 757)

[780] GGGGSGGGGSKDEL (SEQ ID NO: 758)

[781] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSKDEL (SEQ ID NO: 759)

[782] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAEKDEL (SEQ ID NO: 760)

[783] KYKSRRSFIEEKMP (SEQ ID NO: 761)

[784] LKYKSRRSFIEEKMP (SEQ ID NO: 762)

[785] LYKYKSRRSFIEEKMP (SEQ ID NO: 763)

[786] LYCKYKSRRSFIEEKMP (SEQ ID NO: 764)

[787] LYCNKYKSRRSFIEEKMP (SEQ ID NO: 765)

[788] LYKYKSRRSFIDEKKMP (SEQ ID NO: 766)

[789] LYCNKYKSRRSFIDEKKMP (SEQ ID NO: 767)

[790] LYEQKLISEEDLKYKSRRSFIEEKMP (SEQ ID NO: 768)

[791] LYCPYDVPDYAKYKSRRSFIEEKKMP (SEQ ID NO: 769)

[792] LYKKLETFKKTN (SEQ ID NO: 770)

[793] LYEQKLISEEDLKKLETFKKTN (SEQ ID NO: 771)

[794] LYYQRL (SEQ ID NO: 772)

[795] LYEQKLISEEDLYQRL (SEQ ID NO: 773)

[796] LYKRKIIAFALEGKRSKVTRRPKASDYQRL (SEQ ID NO: 774)

[797] LYRNIKCD (SEQ ID NO: 775)

[798] LYEQKLISEEDLRNIKCD (SEQ ID NO: 776)

[799] В некоторых вариантах осуществления слитый белок дополнительно содержит трансмембранный домен CD8-альфа между доменом антитела к CD70 и удерживающим в ЭПР доменом.

[800] Другие подходящие связывающие домены известны в данной области техники. Например, LocSigDB (<http://genome.unmc.edu/LocSigDB/>) представляет собой базу данных экспериментальных сигналов локализации белков для восьми различных субклеточных местоположений (Negi et al., LocSigDB: a database of protein localization signals, Database (Oxford), 2015, 1-7). Кроме того, известные способы могут быть использованы для идентификации дополнительных связывающих доменов, которые сохраняют один или более компонентов комплекса CD70 внутри ЭР или аппарата Гольджи (см., например, Bejarano and Gonzalez, Motif Trap: a rapid method to clone motifs that can target proteins to defined subcellular localizations, Journal of Cell Science, 112, 4207-4211 (1999)).

[801] Молекула может содержать два или более, например, три или более, четыре или более, пять или более удерживающих доменов. В этом случае два или более удерживающих доменов могут быть одинаковыми. Два или более удерживающих доменов могут быть разными.

[802] В некоторых вариантах осуществления экспрессия локализованного внутри клетки антитела к CD70 в Т-клетках включает трансдукцию Т-клеток последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, содержит домен антитела к CD70, а домен внутриклеточной локализации содержит, например, удерживающий в ЭПР домен. В некоторых вариантах осуществления последовательность дополнительно содержит последовательность, кодирующую трансмембранный домен CD8-альфа между доменом антитела к CD70 и удерживающим в ЭПР доменом. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит сигнальный пептид, например, сигнальный пептид CD8-альфа, расположенный на 5'-конце к последовательности, кодирующей домен антитела к CD70.

[803] В некоторых вариантах осуществления снижение или предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает трансдукцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP к CD70, описанный в данном

документе, например, вектора, содержащего рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую TFP к CD70, описанный в данном документе, в Т-клетку, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и домен внутриклеточной локализации, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает трансдукцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP к CD70, описанный в данном документе, например, вектора, содержащего рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую TFP к CD70, описанный в данном документе, в Т-клетку и трансдукцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и домен внутриклеточной локализации, описанные в данном документе, например, вектора, кодирующего слитого белка, в Т-клетку до или после трансдукции Т-клетки рекомбинантной нуклеиновой кислотой, кодирующей TFP к CD70. В некоторых вариантах осуществления предотвращение или снижение уровня фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает трансдукцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP к CD70, описанный в данном документе, в Т-клетку одновременно с нуклеиновой кислотой, кодирующей слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и домен внутриклеточной локализации, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления молекула или вектор рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая CD70-TFP, дополнительно содержит последовательность, кодирующую слитый белок. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая CD70-TFP, и последовательность, кодирующая слитый белок, содержатся в одном опероне.

[804] В некоторых вариантах осуществления снижение или предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает трансдукцию TFP к CD70 в Т-клетку с функциональным нарушением эндогенного гена CD70. В некоторых вариантах осуществления предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает трансдукцию TFP к CD70 в Т-клетку и нарушение эндогенного гена CD70 с использованием методов редактирования генов, описанных в данном документе, до или после трансдукции Т-клетки TFP к CD70. SEQ ID NO. 744-749 представляют собой иллюстративные последовательности направляющей РНК для применения с системой CRISPR/Cas9 для нарушения эндогенного CD70.

[805] Иллюстративные последовательности направляющей РНК для нарушения эндогенного CD70

[806] GTGCATCCAGCGCTTCGCAC (SEQ ID NO: 744)

[807] ATCACCAAGCCCGCGACCAA (SEQ ID NO: 745)

[808] CAGCTACGTATCCATCGTGA (SEQ ID NO: 746)

[809] GCCCCCCTGCCAGTATAGCC (SEQ ID NO: 747)

[810] GAGCTGCAGCTGAATCACAC (SEQ ID NO: 748)

[811] CTCACCCCAAGTGACTCGAG (SEQ ID NO: 749)

[812] В некоторых вариантах осуществления снижение или предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает трансдукцию TFP к CD70 в Т-клетку с функциональным нарушением эндогенного гена СИТА. В некоторых вариантах осуществления предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает трансдукцию TFP к CD70 в Т-клетку и нарушение эндогенного гена СИТА с использованием методов редактирования генов, описанных в данном документе, до или после трансдукции Т-клетки TFP к CD70. SEQ ID NO. 750-755 представляют собой иллюстративные последовательности направляющей РНК для применения с системой CRISPR/Cas9 для нарушения эндогенного СИТА.

[813] Иллюстративные последовательности направляющей РНК для нарушения эндогенного СИТА

[814] TTCCTACACAATGCGTTGCC (SEQ ID NO: 750)

[815] GATATTGGCATAAGCCTCCC (SEQ ID NO: 751)

[816] TCAACTGCGACCAGTTCAGC (SEQ ID NO: 752)

[817] CATCGCTGTTAAGAAGCTCC (SEQ ID NO: 753)

[818] GCCCCTAGAAGGTGGCTACC (SEQ ID NO: 754)

[819] TCCTACCTGTCAGAGCCCCA (SEQ ID NO: 755)

[820] Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления применяются методы мультиплексного редактирования генов для создания Т-клеток с нарушенными генами, которые дефицитны по экспрессии эндогенного TCR и/или лейкоцитарных антигенов человека (HLA) и/или белка программируемой гибели клеток 1 (PD1), и/или CD70, и/или СИТА, и/или других генов.

[821] В некоторых вариантах осуществления снижение или предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает приведение клетки в контакт с антисмысловым олигонуклеотидом, нацеленным на CD70, до или после трансдукции Т-клетки рекомбинантной нуклеиновой кислотой, кодирующей TFP к CD70. В некоторых вариантах осуществления снижение или предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает трансдукцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP к CD70, в Т-клетку, имеющую последовательность, кодирующую киРНК, кшРНК или миРНК, нацеленные на ген CD70. В некоторых вариантах осуществления предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает трансдукцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP к CD70, в Т-клетку и трансдукцию нуклеиновой кислоты, кодирующей киРНК, кшРНК или миРНК, нацеленные на ген CD70, в Т-клетку, до или после трансдукции Т-клетки TFP к CD70. В некоторых вариантах осуществления предотвращение или снижение уровня фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает трансдукцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP к CD70, в Т-клетку одновременно с нуклеиновой кислотой, кодирующей киРНК, кшРНК или миРНК, нацеленные на ген CD70. В некоторых вариантах осуществления CD70-TFP и киРНК, кшРНК или миРНК кодируются одной и той же молекулой нуклеиновой кислоты.

[822] В некоторых вариантах осуществления снижение или предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает приведение клетки в контакт с антисмысловым олигонуклеотидом, нацеленным на СПТА, до или после трансдукции Т-клетки рекомбинантной нуклеиновой кислотой, кодирующей TFP к CD70. В некоторых вариантах осуществления снижение или предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает трансдукцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP к CD70, в Т-клетку, имеющую последовательность, кодирующую киРНК, кшРНК или миРНК, нацеленные на ген СПТА. В некоторых вариантах осуществления предотвращение фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает трансдукцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP к CD70, в Т-клетку и трансдукцию нуклеиновой кислоты, кодирующей киРНК, кшРНК или миРНК, нацеленные на ген СПТА, в Т-клетку, до или после трансдукции Т-клетки TFP к CD70. В некоторых вариантах осуществления предотвращение или снижение уровня фратрицида Т-клеток, экспрессирующих CD70-TFP, включает трансдукцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP к CD70, в Т-клетку одновременно с нуклеиновой кислотой, кодирующей киРНК, кшРНК или миРНК, нацеленные на ген СПТА. В некоторых вариантах осуществления CD70-TFP и киРНК, кшРНК или миРНК кодируются одной и той же молекулой нуклеиновой кислоты.

[823] В некоторых вариантах осуществления CD70-TFP устойчив к фратрициду. В некоторых вариантах осуществления CD70-TFP не имеет повышенный уровень фратрицида по сравнению с TFP, имеющим другой антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления CD70-TFP имеет сниженный уровень фратрицида по сравнению с CD70-TFP, который проявляет фратрицид. В некоторых вариантах осуществления способ получения Т-клеток, включающий устойчивый к фратрициду CD70-TFP, описанный в данном документе, или молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую устойчивый к фратрициду CD70-TFP, описанный в данном документе, не включает снижение или предотвращение фратрицида Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления устойчивый к фратрициду TFP к CD70 содержит scFv или его фрагмент. scFv или его фрагмент могут содержать домен VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 800. scFv или его фрагмент могут содержать домен VL, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1012. Домен VH может содержать CDRH1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 853, CDRH2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 906 и CDRH3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 959. Домен VL может содержать CDRL1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1065, CDRL2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1118, и CDRL3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1171.

Редактирование генов комплекса TCR или эндогенных белок-кодирующих генов

[824] В некоторых вариантах осуществления модифицированные Т-клетки, описанные в данном документе, сконструированы с использованием метода

редактирования генов, например, методов на основе коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, (CRISPR®, см., например, патент США № 8697359), нуклеаз на основе эффектора, подобного активатору транскрипции, (TALE) (TALEN, см., например, патент США № 9393257), мегануклеаз (эндодезоксирибонуклеаз, имеющих большие сайты узнавания, содержащие последовательности двухцепочечной ДНК из 12-40 пар оснований), нуклеазы с «цинковыми пальцами» (ZFN, см., например, Urnov et al., *Nat. Rev. Genetics* (2010) v11, 636-646), или методов на основе нуклеаз megaTAL (слитый белок мегануклеазы и повторов TAL). Таким образом, химерная конструкция может быть сконструирована таким образом, чтобы сочетать желаемые характеристики каждой субъединицы, такие как конформация или способность передавать сигналы. См. также Sander & Joung, *Nat. Biotech.* (2014) v32, 347-55; и June et al., 2009 *Nature Reviews Immunol.* 9.10: 704-716, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления один или более внеклеточных доменов, трансмембранных доменов или цитоплазматических доменов субъединицы TFP сконструированы таким образом, чтобы иметь аспекты более чем одного природного домена субъединицы TCR (т. е. являются химерными).

[825] Недавние разработки технологий, направленных на постоянное изменение генома человека и введение сайт-специфичных геномных модификаций в гены, связанные с заболеванием, закладывают основу для применения в терапевтических целях. Эти технологии теперь широко известны как «редактирование генов».

[826] В некоторых вариантах осуществления для нарушения эндогенного гена TCR или B2M используются методы редактирования генов. В некоторых вариантах осуществления указанный эндогенный ген TCR кодирует альфа-цепь TCR, бета-цепь TCR или альфа-цепь TCR и бета-цепь TCR. В некоторых вариантах осуществления указанный эндогенный ген TCR кодирует гамма-цепь TCR, дельта-цепь TCR или гамма-цепь TCR и дельта-цепь TCR. В некоторых вариантах осуществления методы редактирования генов прокладывают путь для множественного редактирования генома, что позволяет одновременное нарушение нескольких геномных локусов в эндогенном гене TCR. В некоторых вариантах осуществления применяются методы мультиплексного редактирования генов для создания Т-клеток с нарушенным геномом, которые дефицитны по экспрессии эндогенного TCR и/или лейкоцитарных антигенов человека (HLA) и/или белка программируемой гибели клеток 1 (PD1), и/или других генов.

[827] Текущие технологии редактирования генов включают мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), эффекторные нуклеазы TAL (TALEN) и систему коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR) / CRISPR-ассоциированных белков (Cas). Эти четыре основных класса методов редактирования генов имеют общий принцип действия при связывании определяемой пользователем последовательности ДНК и опосредовании двухцепочечного разрыва ДНК (DSB). Затем DSB можно восстановить либо негомологичным соединением концов (NHEJ), либо, когда присутствует донорская ДНК, гомологичной рекомбинацией (HR),

событием, при котором вводится гомологичная последовательность из фрагмента донорской ДНК. Кроме того, нуклеазы никазы генерируют одноцепочечные разрывы ДНК (SSB). DSB могут быть восстановлены путем включения одноцепочечной ДНК (ssDI) или репарации одноцепочечной матрицы (ssTR), событием, при котором вводится гомологичная последовательность из донорской ДНК.

[828] Генетическая модификация геномной ДНК может быть выполнена с использованием сайт-специфических редкощеплящих эндонуклеаз, которые сконструированы таким образом, чтобы распознавать последовательности ДНК в представляющем интерес локусе. Способы получения сконструированных сайт-специфических эндонуклеаз известны в данной области техники. Например, нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN) могут быть сконструированы для распознавания и разрезания заранее определенных участков в геноме. ZFN представляют собой химерные белки, содержащие ДНК-связывающий домен «цинковый палец», слитый с нуклеазным доменом рестриктазы FokI. Домен «цинковый палец» может быть изменен рациональным или экспериментальным путем для получения белка, который связывается с заранее определенной последовательностью ДНК длиной -18 пар оснований. Путем слияния этого сконструированного белкового домена с нуклеазой FokI можно нацеливаться на разрывы ДНК со специфичностью на уровне генома. ZFN широко использовались для добавления, удаления и замены целевого гена у широкого круга эукариотических организмов (рассмотрено в Durai et al. (2005) *Nucleic Acids Res* 33, 5978). Точно так же могут быть созданы TAL-эффекторные нуклеазы (TALEN) для расщепления определенных участков геномной ДНК. Подобно ZFN, TALEN содержит сконструированный сайт-специфический ДНК-связывающий домен, слитый с нуклеазным доменом FokI (рассмотрено в Mak et al. (2013), *Curr Opin Struct Biol.* 23:93-9). В этом случае, однако, ДНК-связывающий домен содержит тандемный массив TAL-эффекторных доменов, каждый из которых специфически распознает одну пару оснований ДНК. Компактные TALEN имеют альтернативную эндонуклеазную архитектуру, которая позволяет избежать необходимости димеризации (Beurdeley et al. (2013), *Nat Commun.* 4: 1762). Компактный TALEN содержит сконструированный сайт-специфический TAL-эффекторный ДНК-связывающий домен, слитый с нуклеазным доменом хоминг-эндонуклеазы I-TevI. В отличие от FokI, I-TevI не требует димеризации для получения двухцепочечного разрыва ДНК, поэтому компактный TALEN функционирует как мономер.

[829] Сконструированные эндонуклеазы на основе системы CRISPR/Cas9 также известны в данной области техники (Ran et al. (2013), *Nat Protoc.* 8:2281-2308; Mali et al. (2013), *Nat Methods* 10:957-63). Технология редактирования генов CRISPR состоит из эндонуклеазного белка, чья специфичность нацеливания на ДНК и активность по ее разрезанию могут быть запрограммированы с помощью короткой направляющей РНК или дуплекса crРНК/tracrРНК. Эндонуклеаза CRISPR состоит из двух компонентов: (1) эффекторной нуклеазы каспазы, обычно микробного Cas9; и (2) короткую «направляющую РНК» или РНК-дуплекс, содержащий целевую последовательность из 18-

20 нуклеотидов, которая направляет нуклеазу в представляющее интерес место в геноме. Путем экспрессии нескольких направляющих РНК в одной и той же клетке, каждая из которых имеет различную нацеливающую последовательность, можно нацеливать разрывы ДНК одновременно на несколько участков генома (мультиплексное геномное редактирование).

[830] В данной области техники известно два класса систем CRISPR (Adli (2018) *Nat. Commun.* 9:1911), каждый из которых содержит несколько типов CRISPR. Класс 1 содержит системы CRISPR типа I и типа III, которые обычно встречаются у архей. И класс II содержит системы CRISPR типа II, IV, V и VI. Хотя наиболее широко используемой системой CRISPR/Cas является система CRISPR-Cas9 типа II, системы CRISPR/Cas были повторно использованы исследователями для редактирования генома. За последние несколько лет было реконструировано более 10 различных белков CRISPR/Cas (Adli (2018) *Nat. Commun.* 9:1911). Среди них особенно интересны белки Cas12a (Cpf1) из *Acidaminococcus* sp (AsCpf1) и *Lachnospiraceae* bacterium (LbCpf1).

[831] Хоминг-эндонуклеазы представляют собой группу встречающихся в природе нуклеаз, которые распознают сайты расщепления из 15-40 пар оснований, обычно встречающиеся в геномах растений и грибов. Они часто связаны с паразитическими элементами ДНК, такими как саморасщепляющиеся интроны и интеины группы 1. Они естественным образом способствуют гомологичной рекомбинации или встраиванию генов в определенные участки генома хозяина, создавая двухцепочечный разрыв в хромосоме, который задействует механизм клеточной репарации ДНК (Stoddard (2006), *Q. Rev. Biophys.* 38: 49-95). Конкретные аминокислотные замены могут перепрограммировать специфичность расщепления ДНК хоминг-нуклеазами (Niyonzima (2017), *Protein Eng Des Sel.* 30(7): 503-522). Мегануклеазы (MN) представляют собой мономерные белки с врожденной нуклеазной активностью, которые получены из бактериальных хоминг-эндонуклеаз и сконструированы для уникального сайта-мишени (Gersbach (2016), *Molecular Therapy.* 24: 430-446). В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза представляет собой хоминг-эндонуклеазу I-CreI. В других вариантах осуществления мегануклеаза представляет собой хоминг-эндонуклеазу I-SceI.

[832] В дополнение к упомянутым четырем основным технологиям редактирования генов были сконструированы химерные белки, включающие гибриды мегануклеаз, ZFN и TALEN, для создания новых мономерных ферментов, в которых используется аффинность связывания ZFN и TALEN, а также специфичность расщепления мегануклеаз (Gersbach (2016), *Molecular Therapy.* 24: 430-446). Например, megaTAL представляет собой единый химерный белок, представляющий собой комбинацию легко присоединяемых ДНК-связывающих доменов из TALEN с высокой эффективностью расщепления мегануклеазами.

[833] Для того чтобы выполнить редактирование генов, нуклеазы, а в случае системы CRISPR/ Cas9 - нРНК, должны быть эффективно доставлены в представляющие интерес клетки. Способы доставки, такие как физические, химические и вирусные

способы, также известны в данной области техники (Mali (2013). *Indian J. Hum. Genet.* 19: 3-8.). В некоторых случаях физические методы доставки могут быть выбраны из методов, но не ограничиваются ими, электропорации, микроинъекции или использования баллистических частиц. С другой стороны, химические методы доставки требуют использования сложных молекул, таких как фосфат кальция, липид или белок. В некоторых вариантах осуществления способы вирусной доставки применяются для методов редактирования генов с использованием вирусов, таких как, но не ограничиваясь ими, аденовирус, лентивирус и ретровирус.

#### Применение в терапевтических целях

[834] TFP-T-клетки, предложенные в данном документе, могут быть использованы для лечения любого заболевания или патологического состояния, связанного с CD70 (например, злокачественного новообразования, экспрессирующего CD70). В некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой заболевание или патологическое состояние, при котором может помочь лечение с помощью адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой нарушение клеточной пролиферации. В некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой опухоль. В некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние представляет собой вирусную инфекцию.

[835] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения заболевания или патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту эффективного количества TFP-T-клеток, представленных в данном документе. В некоторых аспектах заболевание или патологическое состояние представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых аспектах заболевание или патологическое состояние представляет собой вирусную инфекцию.

[836] Любое подходящее злокачественное новообразование можно лечить с помощью предложенных в данном документе TFP T-клеток. Иллюстративные подходящие злокачественные новообразования включают, например, острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), аденокарциному, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому, базально-клеточную карциному, опухоль головного мозга, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, опухоль бронхов, карциному неизвестного первичного происхождения, опухоль сердца, рак шейки матки, хордому, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, протоковую карциному, эмбриональную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, эстезионеробластому, фиброзную гистиоцитому, саркому Юинга, рак глаза, герминому, рак желчного пузыря, рак желудка, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-

кишечного тракта, гестационную трофобластическую болезнь, глиому, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, гистиоцитоз, лимфому Ходжкина, гипофарингеальный рак, интраокулярную меланому, инсулому, Саркома Капоши, рак почки, гистиоцитоз из клеток Лангерганса, рак гортани, рак губы и полости рта, рак печени, лобулярную карциному *in situ*, рак легкого, макроглобулинемию, злокачественную фиброзную гистиоцитому, меланому, карциному из клеток Меркеля, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытой первичной опухолью, срединную карциному с NUT-перегруппировкой, рак ротовой полости, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому, грибовидный микоз, миелодиспластический синдром, миелодиспластическое/миелопролиферативное новообразование, рак полости носа и придаточных пазух носа, рак носоглотки, нейробластома, немелкоклеточный рак легкого, рак ротоглотки, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, папилломатоз, параганглиому, рак парашитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитомы, опухоль гипофиза, плевропульмональную бластома, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак почечной лоханки и мочеточника, ретинобластома, рабдоидную опухоль, рак слюнных желез, синдром Сезари, рак кожи, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, опухоль спинного мозга, рак желудка, Т-клеточную лимфому, тератоидную опухоль, рак яичек, рак горла, тимому и рак тимуса, рак щитовидной железы, рак уретры, рак матки, рак влагалища, рак вульвы и опухоль Вильмса.

[837] В некоторых случаях злокачественное новообразование может представлять собой острый лимфоцитарный рак, острый миелоидный лейкоз, альвеолярную рабдомиосаркому, рак мочевого пузыря (например, карциному мочевого пузыря), рак кости, рак головного мозга (например, медуллобластома), рак молочной железы, рак ануса, анального канала, или аноректума, рак глаза, рак внутривенных желчных протоков, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, носовой полости или среднего уха, рак ротовой полости, рак вульвы, хронический лимфолейкоз (CLL), хронический миелоидный лейкоз, рак толстой кишки, рак пищевода, рак шейки матки, фибросаркому, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), глиобластома, лимфому Ходжкина, рак гортаноглотки, рак почки, рак гортани, лейкоз, гемобластоз, рак печени, рак легкого (например, немелкоклеточную карциному легкого), лимфому, диффузную крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, злокачественную мезотелиому, мастоцитому, меланому, множественную миелому, рак носоглотки, неходжкинскую лимфому (NHL), В-хронический лимфолейкоз, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), лимфому Беркитта, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак брюшины, сальника, рак брыжейки, рак глотки, рак предстательной железы, RCC, ccRCC, рак прямой кишки, рак почки, рак кожи, рак тонкой кишки, рак мягких тканей, солидные опухоли, рак желудка, рак яичек, рак щитовидной железы или рак

мочеточника. Злокачественное новообразование можно охарактеризовать по экспрессии CD70. В некоторых случаях CD70 может экспрессироваться на высоком уровне при множественных гематологических злокачественных новообразованиях, таких как неходжкинская лимфома, множественная миелома и хронический лимфолейкоз, и может экспрессироваться на высоком уровне при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме в виде солидной опухоли (ccRCC). В некоторых случаях злокачественное новообразование может быть любым из RCC (например, ccRCC), глиобластомы, NHL, CLL, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы и фолликулярной лимфомы.

#### Способы лечения

[838] В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания, связанного с экспрессией по меньшей мере одного ассоциированного с опухолью антигена. В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания, причем часть опухоли является отрицательной на ассоциированный с опухолью антиген, а часть опухоли - положительной на ассоциированный с опухолью антиген. Например, антитело или TFP по настоящему изобретению пригодны для лечения субъектов, которые получили лечение заболевания, связанного с повышенной экспрессией указанного опухолевого антигена, причем субъект, который получил лечение повышенных уровней ассоциированного с опухолью антигена, демонстрирует заболевание, связанное с повышенными уровнями ассоциированного с опухолью антигена.

[839] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий антитело или TFP к ассоциированному с опухолью антигену, функционально связанные с промотором для экспрессии в Т-клетках млекопитающего. В одном аспекте изобретение относится к рекомбинантной Т-клетке, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген TFP, для применения в лечении опухолей, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген, где рекомбинантная Т-клетка, экспрессирующая TFP к ассоциированному с опухолью антигену, называется TFP-Т к ассоциированному с опухолью антигену. В одном аспекте TFP-Т к ассоциированному с опухолью антигену по изобретению способна вступать в контакт с опухолевой клеткой по меньшей мере с одним TFP к ассоциированному с опухолью антигену по изобретению, экспрессированным на ее поверхности, таким образом, что TFP-Т нацеливается на опухолевую клетку и рост опухоли ингибируется.

[840] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста опухолевой клетки, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген, включающему приведение в контакт опухолевой клетки с TFP Т-клеткой или антителом к ассоциированному с опухолью антигену по настоящему изобретению таким образом, что TFP-Т активируется в ответ на антиген и нацеливается на раковую клетку, при этом рост опухоли ингибируется.

[841] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения ракового заболевания у субъекта. Способ включает введение субъекту Т-клетки антитела,

биспецифического антитела или TFP к ассоциированному с опухолью антигену по настоящему изобретению таким образом, что раковое заболевание лечится у субъекта. Примером злокачественного новообразования, подлежащего лечению Т-клеткой с TFP против ассоциированного с опухолью антигена по настоящему изобретению, является злокачественное новообразование, связанное с экспрессией ассоциированного с опухолью антигена.

[842] В некоторых вариантах осуществления терапия на основе антител или TFP к ассоциированному с опухолью антигену могут применяться в сочетании с одним или несколькими дополнительными видами лечения, описанными в данном документе.

[843] В одном аспекте в данном документе описан способ клеточной терапии, при которой Т-клетки генетически модифицируют для экспрессии TFP, и TFP-экспрессирующую Т-клетку вводят нуждающемуся в этом реципиенту. Вводимая клетка способна уничтожать опухолевые клетки у реципиента. В отличие от терапии антителами, TFP-экспрессирующие Т-клетки способны к репликации *in vivo*, что приводит к длительной стойкости, что может привести к устойчивому контролю над опухолью. В различных аспектах вводимые пациенту Т-клетки или их потомство сохраняются у пациента в течение по меньшей мере четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев, тринадцати месяцев, четырнадцати месяцев, пятнадцати месяцев, шестнадцати месяцев, семнадцати месяцев, восемнадцати месяцев, девятнадцати месяцев, двадцати месяцев, двадцати одного месяца, двадцати двух месяцев, двадцати трех месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет после введения Т-клетки пациенту.

[844] В некоторых случаях в данном документе описан тип клеточной терапии, при которой Т-клетки модифицируют, например, с помощью транскрибированной *in vitro* РНК, для транзientной экспрессии TFP, и TFP-экспрессирующую Т-клетку вводят нуждающемуся в этом реципиенту. Вводимая клетка способна уничтожать опухолевые клетки у реципиента. Таким образом, в различных аспектах вводимые пациенту Т-клетки сохраняются в течение менее чем одного месяца, например, в течение трех недель, двух недель или одной недели, после введения Т-клетки пациенту.

[845] Без привязки к какой-либо конкретной теории противоопухолевой иммунный ответ, вызываемый TFP-экспрессирующими Т-клетками, может представлять собой активный или пассивный иммунный ответ или, альтернативно, может быть обусловлен прямым или непрямым иммунным ответом. В одном аспекте TFP-трансдуцированные Т-клетки демонстрируют специфическую секрецию провоспалительных цитокинов и сильную цитолитическую активность в ответ на человеческие раковые клетки, экспрессирующие ассоциированный с опухолью антиген, противостоят ингибированию растворимым ассоциированным с опухолью антигеном, опосредуют неспецифический цитолиз и/или опосредуют регрессию установленной опухоли человека. Например, не содержащие антиген опухолевые клетки в пределах неоднородного поля опухоли, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген, могут быть подвержены

непрямому разрушению Т-клетками, перенаправленным ассоциированным с опухолью антигеном, которые ранее оказывали противодействие смежным антигенположительным раковым клеткам.

[846] В одном аспекте человеческие TFP-модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению могут представлять собой вид вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или терапии *in vivo* у млекопитающего. В одном аспекте млекопитающее является человеком.

[847] В отношении иммунизации *ex vivo* перед введением клетки млекопитающему происходит *in vitro* по меньшей мере одно из следующего: i) экспансия клеток; ii) введение в клетки нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP, или iii) криоконсервация клеток, как описано в данном документе.

[848] Помимо использования вакцины на основе клеток с точки зрения иммунизации *ex vivo*, в настоящем изобретении также предлагаются композиции и способы иммунизации *in vivo* с целью вызвать иммунный ответ, направленный против антигена у пациента.

[849] В целом, клетки, активированные и размноженные так, как описано в данном документе, могут использоваться для лечения и предотвращения заболеваний, которые возникают у индивидов с иммунодефицитом. В частности, TFP-модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению используются для лечения заболеваний, нарушений и патологических состояний, связанных с экспрессией ассоциированных с опухолью антигенов. В некоторых аспектах клетки по настоящему изобретению используются для лечения пациентов, подверженных риску развития заболеваний, нарушений и патологических состояний, связанных с экспрессией ассоциированных с опухолью антигенов. Таким образом, в настоящем изобретении предложены способы для лечения или предотвращения заболеваний, нарушений и патологических состояний, связанных с экспрессией ассоциированных с опухолью антигенов, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества TFP-модифицированных Т-клеток по настоящему изобретению.

[850] Антитела или TFP-модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, как более подробно описано ниже.

[851] В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования пролиферации или сокращения популяции клеток, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген, при этом способы включают приведение в контакт популяции клеток, содержащей клетки, экспрессирующие ассоциированный с опухолью антиген, с TFP-Т-клеткой к ассоциированному с опухолью антигену по настоящему изобретению, которая связывается с клеткой, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген. В конкретном аспекте в настоящем изобретении предложены способы ингибирования пролиферации или сокращения популяции раковых клеток, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген, при этом способы включают приведение в контакт

популяции клеток, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген, с антителом или TFP-T-клеткой против ассоциированного с опухолью антигена по настоящему изобретению, которые связываются с клеткой, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген. В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы ингибирования пролиферации или сокращения популяции раковых клеток, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген, при этом способы включают приведение в контакт популяции раковых клеток, экспрессирующих ассоциированный с опухолью антиген, с антителом или TFP-T-клеткой против ассоциированного с опухолью антигена по настоящему изобретению, которые связываются с клеткой, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген. В некоторых аспектах антитело или TFP-T-клетка к ассоциированному с опухолью антигену по настоящему изобретению сокращает численность, число, количество или процентное содержание клеток и/или раковых клеток на по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% у субъекта или в животной модели с множественной миеломой или другим злокачественным новообразованием, связанным с клетками, экспрессирующими ассоциированный с опухолью антиген, по отношению к отрицательному контролю. В одном аспекте субъект представляет собой человека.

[852] В настоящем изобретении также предложены способы предотвращения, лечения и/или сдерживания заболевания, связанного с клетками, экспрессирующими ассоциированный с опухолью антигена (например, рака, экспрессирующего ассоциированный с опухолью антиген), при этом способы включают введение нуждающемуся субъекту антитела или TFP-T-клетки против ассоциированного с опухолью антигена по настоящему изобретению, которая связывается с клеткой, экспрессирующей ассоциированный с опухолью антиген. В одном аспекте субъект представляет собой человека. К неограничивающим примерам нарушений, связанных с клетками, экспрессирующими ассоциированный с опухолью антиген, относятся аутоиммунные заболевания (такие как волчанка), воспалительные заболевания (такие как аллергии и астма) и раковые заболевания (такие как гематологический рак или атипичные раковые заболевания, экспрессирующие ассоциированный с опухолью антиген).

[853] Подходящие дозы описанных в данном документе TFP-T-клеток для терапевтического эффекта должны составлять по меньшей мере  $10^5$  или от около  $10^5$  до около  $10^{10}$  клеток на дозу, например, предпочтительно в серии циклов дозирования. Иллюстративные режим дозирования состоит из четырех однедельных циклов дозирования с возрастающими дозами, начиная, по меньшей мере, с около  $10^5$  клеток на 0 день, например, постепенно увеличивая до целевой дозы около  $10^{10}$  клеток в течение нескольких недель после начала схема с увеличением дозы у одного и того же пациента. Подходящие способы введения включают внутривенный, подкожный, внутриволостной (например, с помощью устройства доступа к резервуару), внутриволостный и непосредственную инъекцию в опухоль.

[854] Эффективное количество или достаточное количество выделенных Т-клеток присутствует в композиции и вводится субъекту таким образом, чтобы они формировали долгосрочные, специфические, противораковые и/или противоопухолевые ответы для уменьшения размера опухоли или устранения роста или повторного роста опухоли, чем в противном случае привело бы отсутствие такого лечения. Желательно, чтобы количество Т-клеток, введенных субъекту, вызывало снижение на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 100% в размере опухоли по сравнению с другими аналогичными условиями, при которых Т-клетки отсутствуют.

[855] Соответственно, для количества вводимых Т-клеток должен учитываться путь введения и он должно быть таким, чтобы вводилось достаточное количество Т-клеток для достижения желаемого терапевтического ответа. Кроме того, количества каждого активного агента, включенного в композиции, описанные в данном документе (например, количество на каждую клетку, с которой необходимо приводить в контакт, или количество на определенную массу тела), могут варьироваться в различных применениях.

#### Комбинированные терапии

[856] Антитело или TFP-экспрессирующая клетка, описанная в данном документе, может использоваться в комбинации с другими известными агентами и видами терапии. Введение «в комбинации», как используется в данном документе, означает, что два (или более) различных средства лечения доставляют субъекту в ходе заболевания, например, два или более средств лечения доставляют после того, как у субъекта диагностировали нарушение, и перед тем, как нарушение было вылечено, или устранено, или лечение было прекращено по другим причинам. В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства лечения все еще происходит, когда начинается доставка второго средства лечения, таким образом, существует перекрытие с точки зрения введения. Иногда в данном документе это называется как «одновременная» или «сопутствующая доставка». В других вариантах осуществления доставка одного средства лечения заканчивается до начала доставки другого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом из случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство лечения является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшей дозе второго средства лечения, или же второе средство лечения снижает симптомы в большей степени, чем наблюдалось бы в том случае, если бы второе средство лечения вводили в отсутствие первого средства лечения, или же аналогичная ситуация наблюдается для первого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления доставка осуществляется таким образом, что снижение симптома или другого параметра, связанного с заболеванием, является более значительным, чем наблюдалось бы в том случае, если бы одно средство лечения доставляли в отсутствие другого. Эффект двух средств лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или большим чем аддитивный. Доставка может осуществляться таким образом, что эффект первого вводимого средства лечения все еще будет определяться во время доставки второго средства.

[857] В некоторых вариантах осуществления «по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое вещество» включает TFP-экспрессирующую клетку. Также предложены Т-клетки, которые экспрессируют множество TFP, которые связываются с одними и теми же или различными антигенами-мишенями либо с одними и теми же или различными эпитопами на одном и том же антигене-мишени. Также предлагаются популяции Т-клеток, в которых первая субпопуляция Т-клеток экспрессирует первый TFP, а вторая субпопуляция Т-клеток экспрессирует второй TFP.

[858] TFP-экспрессирующая клетка, описанная в данном документе, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое вещество могут вводиться одновременно в одной или в отдельных композициях либо вводиться последовательно. В случае последовательного введения TFP-экспрессирующая клетка, описанная в данном документе, может вводиться первой, а дополнительное вещество может вводиться вторым, либо же порядок введения может быть противоположным.

[859] В некоторых вариантах осуществления TFP-Т-клетки, представленные в данном документе, вводят по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. Любое подходящее дополнительное терапевтический агент можно вводить вместе с TFP-Т-клеткой, предложенной в данном документе. В некоторых аспектах дополнительный терапевтический агент выбран из облучения, цитотоксического агента, химиотерапевтического агента, цитостатического агента, антигормонального агента, ингибитора EGFR, иммуностимулирующего агента, антиангиогенного агента и их комбинаций.

[860] В дополнительных аспектах TFP-экспрессирующие клетки, описанные в данном документе, могут быть использованы в схеме лечения в комбинации с хирургическим вмешательством, химиотерапией, облучением, иммунодепрессантами, например, циклоспорином, азатиоприном, метотрексатом, микофенолатом и такролимусом, антителами или другими иммунодеструктивными средствами, например, алемтузумабом, антителами к CD3 или другими видами терапии на основе антител, циклофосфамидом, флударабином, циклоспорином, такролимусом, рапамицином, микофеноловой кислотой, стероидами, ромидепсином, цитокинами и облучением, пептидной вакциной, например, описанной в Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971.

[861] В одном варианте осуществления субъекту могут вводить агент, который снижает или облегчает побочный эффект, связанный с введением TFP-экспрессирующей клетки. Побочные эффекты, связанные с введением TFP-экспрессирующей клетки, включают, помимо прочего, синдром высвобождения цитокинов (СВЦ) и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (ГЛГ), также называемый синдромом активации макрофагов (САМ). К симптомам СВЦ относится высокая температура, тошнота, преходящая гипотензия, гипоксия и т. п. Соответствующим образом, способы, описанные в данном документе, могут включать введение TFP-экспрессирующей клетки, описанной в данном документе, субъекту и дополнительное введение вещества для сдерживания повышенных уровней растворимого фактора, возникающих вследствие лечения TFP-

экспрессирующей клеткой. В одном варианте осуществления растворимый фактор, повышенный у субъекта, представляет собой один или более из IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 и IL-6. Таким образом, вещество, вводимое для лечения этого побочного эффекта, может представлять собой вещество, которое нейтрализует один или более из этих растворимых факторов. К таким веществам относится, помимо прочего, стероид, ингибитор TNF $\alpha$  и ингибитор IL-6. Примером ингибитора TNF $\alpha$  является этанерцепт (продается под названием ENBREL®). Примером ингибитора IL-6 является тоцилизумаб (продается под названием АСТЕМРА®).

[862] В одном варианте осуществления субъекту могут вводить вещество, которое повышает активность TFP-экспрессирующей клетки. Например, в одном варианте осуществления агент может представлять собой агент, который ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, например, белок программируемой гибели клеток 1 (PD1), могут в некоторых вариантах осуществления снижать способность экспрессирующей TFP клетки сформировать иммунный эффекторный ответ. К примерам ингибирующих молекул относится PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR-бета. Ингибирование ингибирующей молекулы, например, путем ингибирования ДНК, РНК или уровня белка, может оптимизировать эффективность TFP-экспрессирующей клетки. В вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, например, ингибирующая нуклеиновая кислота, например, дцРНК, например, киРНК или кшРНК, может использоваться для ингибирования экспрессии ингибирующей молекулы в TFP-экспрессирующей клетке. В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой мшРНК. В одном варианте осуществления ингибирующая молекула ингибируется внутри TFP-экспрессирующей клетки. В этих вариантах осуществления молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию ингибирующей молекулы, соединена с нуклеиновой кислотой, которая кодирует компонент, например, все компоненты, TFP. В одном варианте осуществления ингибитор ингибирующего сигнала может представлять собой, например, антитело или фрагмент антитела, который связывается с ингибирующей молекулой. Например, агент может представлять собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с PD1, PD-L1, PD-L2 или CTLA4 (например, ипилимумаб (также называемый MDX-010 и MDX-101 и представленный на рынке как YERVOY®; Bristol-Myers Squibb; тремелимумаб (моноклональное антитело IgG2, доступное от компании Pfizer, ранее известный как тицилимумаб, CP-675 206)). В одном варианте осуществления вещество представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые связывается с Т-клеточным иммуноглобулином и муциновым доменом 3 (TIM3). В одном варианте осуществления вещество представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с геном активации лимфоцитов 3 (LAG3).

[863] В некоторых вариантах осуществления агент, который усиливает активность экспрессирующей TFP клетки, может представлять собой, например, слитый белок, содержащий первый домен и второй домен, где первый домен представляет собой

ингибирующую молекулу или ее фрагмент, а второй домен представляет собой полипептид, связанный с положительным сигналом, например, полипептид, содержащий внутриклеточный сигнальный домен, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид, который связан с положительным сигналом, может включать костимулирующий домен CD28, CD27, ICOS, например, внутриклеточный сигнальный домен CD28, CD27 и/или ICOS и/или первичный сигнальный домен, например, CD3 дзета, например, как описано в данном документе. В одном варианте осуществления слитый белок экспрессируется той же клеткой, которая экспрессирует TFP. В еще одном варианте осуществления слитый белок экспрессируется клеткой, например, Т-клеткой, которая не экспрессирует TFP к ассоциированному с опухолью антигену.

[864] В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент включает иммуностимулирующий агент.

[865] В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий агент представляет собой агент, который блокирует сигналинг ингибирующего рецептора иммунной клетки или его лиганда. В некоторых аспектах ингибирующий рецептор или лиганд выбран из ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA-4, также известного как CD152), белка программируемой гибели клеток 1 (также PD-1 или CD279), лиганда-1 белка программируемой гибели клеток (также PD-L1 или CD274), трансформирующего фактора роста-бета (TGF $\beta$ ), гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3, также CD223), Tim-3 (клеточного рецептора 2 вируса гепатита А или HAVCR2 или CD366), нейритина, В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (также BTLA или CD272), иммуноглобулин-подобных рецепторов клеток-киллеров (KIR) и их комбинации. В некоторых аспектах агент выбран из антитела к PD-1 (например, пембролизумаба или ниволумаба) и антитела к PD-L1 (например, атезолизумаба), антитела к CTLA-4 (например, ипилимумаба), антитела к TIM3, молекулы-1 адгезии клеток, связанной с карциноэмбриональным антигеном, (CECAM-1, также CD66a) и 5 (CEACAM-5, также CD66e), V-set иммунорегуляторного рецептора (также VISR или VISTA), ассоциированного с лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (также LAIR1 или CD305), CD160, рецептора естественных клеток-киллеров 2B4 (также CD244 или SLAMF4) и их комбинации. В некоторых аспектах агент представляет собой пембролизумаб. В некоторых аспектах агент представляет собой ниволумаб. В некоторых аспектах агент представляет собой атезолизумаб.

[866] В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1. В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство, которое ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, выбран из антитела, пептидомиметика и малой молекулы. В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство, которое ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, выбран из пембролизумаба (KEYTRUDA), ниволумаба (OPDIVO), атезолизумаба, авелумаба, пидилизумаба,

дурвалумаба, сульфамонетоксина 1 и сульфаметизола 2. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, представляет собой любой терапевтический агент, который, как известно в данной области техники, обладает такой активностью, например, как описано в Weinmann et al., Chem Med Chem, 2016, 14:1576 (DOI: 10.1002/cmdc.201500566), включенной в полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, входит в состав той же фармацевтической композиции, что и антитело, представленное в данном документе. В некоторых вариантах осуществления агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, включен в состав фармацевтической композиции, которая отличается от той, в которую входит антитело, представленное в данном документе. В некоторых вариантах осуществления агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, вводят до введения антитела, представленного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, вводят после введения антитела, представленного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, вводят одновременно с антителом, представленным в данном документе, но агент и антитело вводят в виде отдельных фармацевтических композиций.

[867] В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий агент представляет собой агонист костимулирующего рецептора иммунной клетки. В некоторых аспектах костимулирующий рецептор выбран из GITR, OX40, ICOS, LAG-2, CD27, CD28, 4-1BB, CD40, STING, Toll-подобного рецептора, RIG-1 и NOD-подобного рецептора. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой антитело.

[868] В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий агент модулирует активность аргиназы, индоламин-2,3-диоксигеназы или рецептора аденозина A2A.

[869] В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий агент представляет собой цитокин. В некоторых аспектах цитокин выбран из IL-2, IL-5, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 и их комбинаций.

[870] В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий агент представляет собой онколитический вирус. В некоторых аспектах онколитический вирус выбран из вируса простого герпеса, вируса везикулярного стоматита, аденовируса, вируса болезни Ньюкасла, вируса осповакцины и вируса Мароба.

[871] Дополнительные примеры дополнительных терапевтических агентов включают таксан (например, паклитаксел или доцетаксел); агент на основе платины (например, карбоплатин, оксалиплатин и/или цисплатин); ингибитор топоизомеразы (например, иринотекан, топотекан, этопозид и/или митоксантрон); фолиновую кислоту (например, лейковорин); или нуклеозидный ингибитор метаболизма (например, фторурацил, капецитабин и/или гемцитабин). В некоторых вариантах осуществления

дополнительный терапевтический агент представляет собой фолиновую кислоту, 5-фторурацил и/или оксалиплатин. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой 5-фторурацил и иринотекан. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой таксан и агент на основе платины. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой паклитаксел и карбоплатин. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой пеметрексат. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой терапевтический агент таргетного действия, такой как агент, нацеленный на EGFR, RAF или MEK.

[872] Дополнительный терапевтический агент можно вводить любыми подходящими способами. В некоторых вариантах осуществления лекарственный препарат, представленный в данном документе, и дополнительный терапевтический агент включены в одну и ту же фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, и дополнительный терапевтический агент включены в различные фармацевтические композиции.

[873] В вариантах осуществления, когда антитело, представленное в данном документе, и дополнительный терапевтический агент включен в различные фармацевтические композиции, введение антитела может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента. В некоторых аспектах введение антитела, представленного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение около одного месяца друг после друга. В некоторых аспектах осуществления введение антитела, представленного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение около одной недели друг после друга. В некоторых аспектах введение антитела, представленного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение около одного дня друг после друга. В некоторых аспектах осуществления введение антитела, представленного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение около двенадцати часов друг после друга. В некоторых аспектах осуществления введение антитела, представленного в данном документе, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение около одного часа друг после друга.

[874] В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой агент, который повышает уровни CD70 в раковых клетках, связанные с повышенной экспрессией CD70. В некоторых вариантах осуществления агент, повышающий уровень CD70, представляет собой агент, ингибирующий метилирование ДНК. В некоторых вариантах осуществления агент, повышающий уровень CD70, представляет собой агент, ингибирующий ДНК-метилтрансферазу. В некоторых вариантах осуществления агент, который повышает уровень CD70, представляет собой гипометилирующий агент. Примеры гипометилирующего агента включают, но не

ограничиваются ими, 5-азациитидин и децитабин, а также любой гипометилирующий агент, известный в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления гипометилирующий агент представляет собой 5-азациитидин. В некоторых вариантах осуществления гипометилирующий агент представляет собой децитабин. В некоторых вариантах осуществления гипометилирующий агент представляет собой производное децитабина или производное 5-азациитидина. В некоторых вариантах осуществления гипометилирующий агент представляет собой этерифицированный азациитидин, ацетилированный азациитидин, этерифицированный децитабин или ацетилированный децитабин.

#### Способы диагностики

[875] Также предложены способы обнаружения присутствия CD70 в клетках субъекта. Такие способы можно использовать, например, для прогнозирования и оценки чувствительности к лечению антителом, предложенным в данном документе.

[876] В некоторых вариантах осуществления у субъекта отбирают образец крови и определяют фракцию клеток, экспрессирующих CD70. В некоторых аспектах определяется относительное количество CD70, экспрессируемого такими клетками. Долю клеток, экспрессирующих CD70, и относительное количество CD70, экспрессируемого такими клетками, можно определить любым подходящим методом. В некоторых вариантах осуществления для проведения таких измерений используют проточную цитометрию. В некоторых вариантах осуществления для проведения такого измерения используют сортировку флуоресцентно активируемых клеток (FACS). См. Li et al., J. Autoimmunity, 2003, 21:83-92, где описаны способы оценки экспрессии CD70 в периферической крови.

#### Заболевания или патологического состояния, связанные с опухолевым антигеном

[877] У многих пациентов, получавших лечение противораковыми средствами, нацеленными на одну мишень на опухолевой клетке, например, BCMA, CD19, CD20, CD22, CD123, MUC16, MSLN и т. д., со временем развивается устойчивость, так как активируются механизмы уклонения от ответа, такие как альтернативные сигнальные пути и циклы обратной связи. Терапевтические средства с двойной специфичностью пытаются решить данную проблему, объединив мишени, которые часто замещают друг друга в качестве путей отступления. Терапевтические популяции Т-клеток, имеющие TCR, специфичные к более чем одному ассоциированному с опухолью антигену, являются многообещающими комбинированными терапевтическими средствами. В некоторых вариантах осуществления TFP-Т-клетки с двойной специфичностью вводятся с дополнительным противораковым средством; в некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой антитело или его фрагмент, другую TFP-Т-клетку, CAR-Т-клетку или малую молекулу. Примеры ассоциированных с опухолью антигенов включают, помимо прочего, онкофетальные антигены (например, антигены, которые экспрессируются в тканях плода и злокачественных соматических клетках), онковирусные антигены (например, антигены, которые кодируются онкогенными

трансформирующими вирусами), сверхэкспрессированные/накопленные антигены (например, антигены, которые экспрессируются как нормальными, так и опухолевыми тканями, причем уровень экспрессии значительно выше для опухоли), раково-тестикулярные антигены (например, антигены, которые экспрессируются только раковыми клетками и тканями органов размножения у взрослых, такими как яички и плацента), линиеспецифические антигены (например, антигены, которые в основном экспрессируются одним гистотипом злокачественного новообразования), мутировавшие антигены (например, антигены, которые экспрессируются злокачественным новообразованием в результате генетической мутации или изменения транскрипции), посттрансляционно измененные антигены (например, ассоциированные с опухолью изменения гликозилирования и т. д.) и идиотипические антигены (например, антигены из высокополиморфных генов, где опухолевая клетка экспрессирует специфический клонотип, например, как в В-клеточной, Т-клеточной лимфоме/лейкозе вследствие клональных аберраций). Примеры ассоциированных с опухолью антигенов включают, помимо прочего, антигены альфа-актина-4, ARTC1, альфафетопротейна (AFP), слитого белка BCR-ABL (b3a2), B-RAF, CASP-5, CASP-8, бета-катенина, Cdc27, CDK4, CDK12, CDKN2A, CLPP, COA-1, CSNK1A1, CD79, CD79B, слитого белка *dek-can*, EFTUD2, фактора элонгации-2, слитого белка ETV6-AML1, FLT3-ITD, FNDC3B, FN1, GAS7, GPNMB, HAUS3, HSDL1, слитого белка LDLR-фукозилтрансферазы AS, HLA-A2d, HLA-A11d, hsp70-2, MART2, MATN, ME1, MUM-1f, MUM-2, MUM-3, нео-PAP, миозин класса I, NFYC, OGT, OS-9, p53, слитого белка pml-RAR-альфа, PPP1R3B, PRDX5, PTPRK, K-ras, N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, SYT-SSX1 или слитого белка -SSX2, TGF-бета-RII, тризофосфатазимы, BAGE-1, D393-CD20n, циклина-A1, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-8, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GnTVf, HERV-K-MEL, KK-LC-1, KM-HN-1, LAGE-1, LY6K, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12 m, MAGE-C1, MAGE-C2, mucink, NA88-A, NY-ESO-1/LAGE-2, SAGE, Sp17, SSX-2, SSX-4, TAG-1, TAG-2, TRAG-3, TRP2-INT2g, XAGE-1b/GAGED2a, гена/белка, CEA, gp100/Pmel17, маммаглобина-A, мелан-A/MART-1, NY-BR-1, OA1, PAP, PSA, RAB38/NY-MEL-1, TRP-1/gp75, TRP-2, тирозиназы, адипофилина, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CALCA, CD45, CD274, CPSF, циклина D1, DKK1, ENAH (hMena), EphCAM, EphA3, EZH2, FGF5, глипикана-3, G250/MN/CAIX, HER-2/neu, HLA-DOB, гепсина, IDO1, IGF2B3, IL13R-альфа-2, желудочно-кишечной карбоксилэстеразы, альфа-фетопротейна, калликреина 4, KIF20A, Lentsin, M-CSF, MCSP, mdm-2, Meloe, мидкина, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, p53, PAX5, PBF, PRAME, PSMA, RAGE-1, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, сецернина 1, SOX10, STEAP1, сурвивина, теломеразы, TPBG, VEGF и DT1.

#### Фармацевтические композиции

[878] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать TFP-экспрессирующую клетку, например, множество TFP-экспрессирующих клеток, как описано в данном документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или

физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие композиции могут содержать буферы, например, нейтральный буферный раствор, фосфатно-буферный раствор и т.п.; углеводороды, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатные средства, такие как EDTA или глутатион; вспомогательные средства (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему изобретению в одном аспекте составлены для внутривенного введения.

[879] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут вводиться таким способом, который соответствует заболеванию, подлежащему лечению (или предотвращению). Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и степень тяжести заболевания пациента, хотя соответствующие дозы могут быть установлены в клинических исследованиях.

[880] В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит, например, отсутствуют определяемые уровни загрязняющего вещества, например, выбранного из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, компетентного по репликации лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, ВИЧ gag, остаточных частиц, покрытых антителами к CD3/CD28, мышинных антител, смешанной сыворотки человека, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки, компонентов культуральной среды, упаковывающей вектор клетки или плазмидных компонентов, а также бактерии и гриба. В одном варианте осуществления бактерия представляет собой по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* группы А.

[881] Когда указывается «иммунологически эффективное количество», «противоопухолевое эффективное количество», «ингибирующее опухоль эффективное количество» или «терапевтическое количество», точное количество композиции по настоящему изобретению, подлежащее введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий по возрасту, весу, размеру опухоли, степени инфекции или метастазирования, а также состояния пациента (субъекта). В целом, можно отметить, что фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетки, описанные в данном документе, может вводиться в дозах от  $10^4$  до  $10^9$  клеток/кг массы тела, в некоторых случаях - от  $10^5$  до  $10^6$  клеток/кг массы тела, включая все целые значения в этих диапазонах. Композиции Т-клеток также могут вводиться несколько раз в этих дозах. Клетки могут вводиться с помощью методов инфузии, которые широко известны в области иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988).

[882] В определенных аспектах может быть необходимым введение активированных Т-клеток субъекту, затем повторное взятие крови впоследствии (или осуществление афереза), активация полученных Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением и повторная инфузия пациенту этих активированных и размноженных Т-

клеток. Этот процесс может выполняться несколько раз каждые несколько недель. В некоторых аспектах Т-клетки могут быть активированы во взятой крови объемом от 10 куб. см до 400 куб. см. В некоторых аспектах Т-клетки активируют во взятой крови объемом 20 куб. см, 30 куб. см, 40 куб. см, 50 куб. см, 60 куб. см, 70 куб. см, 80 куб. см, 90 куб. см или 100 куб. см.

[883] Ведение субъекту композиций может осуществляться любым удобным способом, включая ингаляцию аэрозолем, инъекцию, пероральное поступление, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в данном документе, могут вводиться пациенту трансартериально, подкожно, внутривенно, внутривенно, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутрибрюшинно. В одном аспекте композиции Т-клеток по настоящему изобретению вводят пациенту путем внутривенной или подкожной инъекции. В одном аспекте композиции Т-клеток по настоящему изобретению вводят путем в/в инъекции. Композиции Т-клеток могут инъектировать непосредственно в опухоль, лимфатический узел или в область инфекции.

[884] В конкретном иллюстративном аспекте субъект может подвергаться лейкоферезу, при этом лейкоциты собирают, обогащают или деплецируют *ex vivo*, чтобы отобрать и/или выделить представляющие интерес клетки, например, Т-клетки. Такие Т-клеточные изоляты могут быть размножены известными в данной области техники способами и обработаны таким образом, что может быть введена одна или более конструкций TFP по настоящему изобретению, таким образом, создавая TFP-экспрессирующую Т-клетку по настоящему изобретению. Нуждающиеся в этом субъекты могут впоследствии подвергаться стандартному лечению высокодозной химиотерапией с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых аспектах после трансплантации или одновременно с ней субъектам выполняют инфузию размноженных TFP-Т-клеток по настоящему изобретению. В дополнительном аспекте размноженные клетки вводят до операции или после нее.

[885] Дозировка вышеприведенных требующих введения пациенту видов лечения будет варьироваться в зависимости от точной природы состояния, подлежащего лечению, и реципиента лечения. Масштабирование доз для введения человеку можно выполнять в соответствии с принятыми в данной области практиками. Доза алемтузумаба (СAMPATH®), например, обычно будет варьироваться в диапазоне от 1 до около 100 мг для взрослых пациентов, как правило, ее вводят ежедневно в течение периода времени от 1 до 30 дней. Предпочтительная суточная доза составляет от 1 до 10 мг в день, хотя в некоторых случаях могут быть использованы более высокие дозы до 40 мг в день (описано, например, в патенте США № 6120766).

[886] В одном варианте осуществления TFP вводят в Т-клетки, например, используя транскрипцию *in vitro*, а субъекту (например, человеку) выполняют первоначальное введение TFP-Т-клеток по настоящему изобретению, а также одно или более последующих введений TFP-Т-клеток по настоящему изобретению, причем одно

или более последующих введений выполняют менее чем через 15 дней, например, через 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. В одном варианте осуществления субъекту (например, человеку) выполняют более одного введения TFP-T-клеток по настоящему изобретению в неделю, например, выполняют 2, 3 или 4 введения TFP-T-клеток по настоящему изобретению в неделю. В одном варианте осуществления субъекту (например, человеку) выполняют более одного введения TFP-T-клеток в неделю (например, 2, 3 или 4 введения в неделю) (также называется в данном документе как цикл) с последующим перерывом введения TFP-T-клеток на одну неделю, а затем субъекту выполняют одно или более дополнительных введений TFP-T-клеток (например, более одного введения TFP-T-клеток в неделю). В еще одном варианте осуществления субъекту (например, человеку-субъекту) выполняют более одного цикла TFP-T-клеток, а период времени между каждым циклом составляет менее чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, или 3 дня. В одном варианте осуществления TFP-T-клетки вводят через день за 3 введения в неделю. В одном варианте осуществления TFP-T-клетки по настоящему изобретению вводят в течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель.

[887] В одном аспекте Т-клетки с TFP против ассоциированного с опухолью антигена получают с использованием лентивирусных вирусных векторов, таких как лентивирусы. Полученные таким образом TFP-T-клетки будут иметь устойчивую экспрессию TFP.

[888] В одном аспекте TFP-T-клетки транзистентно экспрессируют векторы TFP в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 дней после трансдукции. Временная экспрессия TFP может быть осуществлена путем доставки вектора TFP РНК. В одном аспекте РНК TFP транслируют в Т-клетку путем электропорации.

[889] Потенциальной проблемой, которая может возникнуть у пациентов, получающих лечение с помощью Т-клеток, транзистентно экспрессирующих TFP (в частности с помощью мышинных TFP-T-клеток, несущих scFv), является анафилаксия после нескольких лечений.

[890] Не ограничиваясь данной теорией, считается, что подобный анафилактический ответ может быть вызван развивающимся гуморальным ответом против TFP у пациента, т. е. антителами к TFP, имеющими изотип против IgE. Полагают, что клетки пациента, вырабатывающие антитела, подвергаются переключению класса с изотипа IgG (который не вызывает анафилаксию) на изотип IgE, когда существует перерыв в воздействии антигеном, составляющий от десяти до четырнадцати дней.

[891] Если пациент подвержен высокому риску образования антител к TFP в ходе лечения временной терапией TFP (например, полученные путем трансдукции РНК), перерывы в инфузии TFP-T-клеток не должны длиться более, чем от десяти до четырнадцати дней.

[892] Высвобождение цитокинов

[893] Синдром высвобождения цитокинов представляет собой форму синдрома

системного воспалительного ответа, который возникает как осложнение некоторых заболеваний или инфекций, а также является побочным эффектом некоторых лекарственных средств на основе моноклональных антител, а также адоптивной Т-клеточной терапии. TFP-T-клетки могут проявлять лучшую киллерную активность, чем CAR-T-клетки. TFP-T-клетки, введенные субъекту, могут проявлять лучшую киллерную активность, чем CAR-T-клетки, введенные субъекту. Это может быть одним из преимуществ TFP-T-клеток по сравнению с CAR-T-клетками. TFP-T-клетки могут демонстрировать меньшее высвобождение цитокинов, чем CAR-T-клетки. Субъект, которому вводили TFP-T-клетки, может демонстрировать меньшее высвобождение цитокинов, чем субъект, которому вводили CAR-T-клетки. Это может быть одним из преимуществ TFP-T-клеточной терапии по сравнению с терапией CAR-T-клетками. TFP-T-клетки могут проявлять аналогичную или лучшую киллерную активность, чем CAR-T-клетки, и TFP-T-клетки могут демонстрировать меньшее высвобождение цитокинов, чем CAR-T-клетки. TFP-T-клетки, введенные субъекту, могут проявлять подобную или лучшую киллерную активность, чем CAR-T-клетки, введенные субъекту, и у субъекта можно наблюдать меньшее высвобождение цитокинов, чем у субъекта, которому вводили CAR-T-клетки. Это может быть одним из преимуществ TFP-T-клеточной терапии по сравнению с терапией CAR-T-клетками.

[894] В некоторых случаях высвобождение цитокинов при лечении TFP-T-клетками меньше, чем высвобождение цитокинов при лечении CAR-T-клетками. В некоторых вариантах осуществления высвобождение цитокинов при лечении TFP-T-клетками на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% меньше, чем высвобождение цитокинов при лечении CAR-T-клетками. Различные цитокины могут высвобождаться в меньшей степени при лечении TFP T-клетками, чем при лечении CAR-T-клетками. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-13, IL-5, IL-10, sCD137, GM-CSF, MIP-1 $\alpha$ , MIP -1 $\beta$  или их комбинацию. В некоторых случаях лечение TFP-T-клетками приводит к высвобождению меньшего количества перфорина, гранзима А, гранзима В или их комбинации, чем лечение CAR-T-клетками. В некоторых вариантах осуществления перфорина, гранзима А или гранзима В, высвобождаемых при лечении TFP-T-клетками, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% или на по меньшей мере 60% меньше, чем при лечении CAR-T-клетками.

[895] В некоторых вариантах осуществления для данного цитокина после лечения высвобождается по меньшей мере на 10% меньшее количество данного цитокина по сравнению с количеством данного цитокина у млекопитающего, получающего лечение CAR-T-клеткой, содержащей тот же связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления данный цитокин содержит один или более цитокинов, выбранных из группы, состоящей из IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-13, IL-5, IL-10, sCD137, GM-CSF,

MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , и любой их комбинации.

[896] TFP-T-клетки могут проявлять аналогичную или лучшую активность в уничтожении опухолевых клеток, чем CAR-T-клетки. В некоторых вариантах осуществления рост опухоли у млекопитающего ингибируется таким образом, что размер опухоли составляет не более 10%, не более 20%, не более 30%, не более 40%, не более 50% или не более 60% размера опухоли у млекопитающего, получавшего лечение T-клетками, не экспрессирующими TFP, по меньшей мере через 8 дней после лечения, при этом у млекопитающего, получавшего лечение T-клетками, экспрессирующими TFP, и у млекопитающего, получавшего лечение T-клетками, не экспрессирующими TFP, тот же размер опухоли до лечения. В некоторых вариантах осуществления рост опухоли у млекопитающего полностью ингибируется. В некоторых вариантах осуществления рост опухоли у млекопитающего полностью ингибируется в течение по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 50 дней, по меньшей мере 60 дней, по меньшей мере 70 дней, по меньшей мере 80 дней, по меньшей мере 90 дней, по меньшей мере 100 дней и более. В некоторых вариантах осуществления популяция T-клеток, трансдуцированных TFP, уничтожает одинаковое количество опухолевых клеток по сравнению с CAR-T-клетками, содержащими такой же связывающий домен.

[897] TFP-T-клетки могут демонстрировать другой профиль экспрессии генов, чем клетки, которые не экспрессируют TFP. В некоторых случаях TFP-T-клетки могут демонстрировать профили экспрессии генов, подобным таковым у CAR-T-клеток. В некоторых других случаях TFP-T-клетки могут демонстрировать профили экспрессии генов, отличные от профилей CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция T-клеток, трансдуцированных TFP, имеет профиль экспрессии генов, отличный от профиля экспрессии генов CAR-T-клеток, содержащих тот же связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена в T-клетках, трансдуцированных TFP, отличается от уровня экспрессии гена в CAR-T-клетках, содержащих тот же связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления ген играет роль в презентации антигена, сигналинге TCR, гомеостазе, метаболизме, сигналинге хемокинов, сигналинге цитокинов, сигналинге Toll-подобных рецепторов, сигналинге MMP и молекул адгезии или сигналинге, связанном с TNFR.

#### ПРИМЕРЫ

[898] Далее будет подробно описано изобретение со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только в целях иллюстрации, и их не следует интерпретировать как ограничивающие, если не указано иное. Таким образом, изобретение не должно восприниматься как такое, которое ограничивается следующими примерами, оно должно восприниматься скорее как такое, которое охватывает любые и все варианты, которые станут очевидными в результате идей, представленных в данном документе. Без дополнительного описания, полагают, что с использованием предшествующего описания и следующих ниже иллюстративных

примеров специалист в данной области техники может получать и применять соединения по настоящему изобретению и осуществлять на практике заявленные способы. Следующие демонстрационные примеры конкретно указывают различные аспекты данного изобретения, и их не следует интерпретировать как ограничивающие каким-либо образом остальную часть описания.

[899] Ниже приведены примеры способов и композиций согласно данному изобретению. Понятно, что различные другие варианты осуществления могут быть реализованы на практике, учитывая общее описание, представленное в данном документе.

[900] Полное раскрытие всех патентных и непатентных публикаций, цитируемых в данном документе, включено посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Пример 1: Получение антител к CD70

[901] Кастрированного наивного самца альпаки иммунизировали следующими 5 линиями раковых клеток:

1. KOPN-8 человека (лейкоз из клеток-предшественников В-лимфоцитов человека, DSMZ № ACC 552).

2. HCC-1419 человека (молочная железа человека, грудная железа, эпителиальная, ATCC CRL-2326).

3. RERF-LC-KJ человека (аденокарцинома, JCRB № JCRB0081).

4. JVM-3 человека (хронический В-клеточный лейкоз, DSMZ № ACC 18), сконструированная для сверхэкспрессии EGFRvIII человека.

5. UACC-62 человека (меланотическая меланома человека, кожа, Addex Bio, кат. № C0020003), сконструированная для сверхэкспрессии укороченного CD22 человека с удаленными доменами 1-4.

[902] Четыре цикла инъекций проводили подкожно с  $2 \times 10^7$  клетками на клеточную линию в адьюванте Gerbu P. График инъекций был следующим: 3 недели между 1-й и 2-й инъекциями, 2 недели между 2-й и 3-й инъекциями и 2 недели между 3-й и 4-й инъекциями. Через 4 и 8 дней после 4-й инъекции брали 100 мл антикоагулированной крови для получения лимфоцитов периферической крови (PBL). Образцы тотальной РНК, полученные из PBL, затем объединяли, и около 50 мкг пула тотальной РНК использовали в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК с олиго-дТ праймером. Используя эту кДНК, кодирующие VHH последовательности амплифицировали с помощью ПЦР, расщепляли с помощью SAPI и клонировали в сайт SAPI фагмидного вектора pMECS-GG. Электрокомпетентные клетки *E. coli* TG1 трансформировали рекомбинантной фагмидой pMECS-GG, в результате чего была получена библиотека VHH фагового дисплея, состоящая примерно из  $10^8$  независимых трансформантов.

[903] Пэннинг иммунной библиотеки VHH против CD70 человека

[904] Было проведено три раунда пэннинга для выделения VHH к CD70 из иммунной библиотеки. Во всех раундах фаг, отображающий VHH, был получен путем инфицирования фагом-хелпером *E. coli* TG1, который содержит фагмиды библиотеки VHH, и последующей преципитации PEG/NaCl. В каждом цикле пэннинга  $\sim 10^{12}$  фаговых

частиц блокировали в буфере для пэннинга (PBS+0,01% Tween20+4% мас./об. обезжиренного сухого молока), а затем инкубировали со стрептавидином на магнитных частицах, покрытых биотинилированным человеческим IgG1 Fc (Acro, IG1- H82E2), для удаления неспецифических фагов. После удаления фаги инкубировали со стрептавидиновыми магнитными частицами, покрытыми биотинилированным человеческим CD70 (Acro, CDL-H82Q9), в течение по меньшей мере 1 часа при комнатной температуре. После промывки фаги элюировали с магнитных частиц и использовали для инфицирования *E. coli* для размножения фагмид и получения фага для следующего раунда пэннинга. Концентрация CD70 человека варьировалась в каждом раунде следующим образом:

Раунд 1: 100нМ

Раунд 2: 100нМ

Раунд 3: 50нМ

Раунд 2а: 0,1нМ

Раунд 3а: 0,1 нМ плюс конкуренция по скорости диссоциации в течение ночи со 100 нМ CD70 человека в растворе

[905] После последнего раунда пэннинга восстановленный фаг использовали для инфицирования *E. coli* SS320. Штамм SS320 обеспечивает экспрессию растворимых VHH с гистиридиновой меткой, которые можно использовать в ELISA для идентификации клонов, связывающихся с мишенью.

*ELISA на основе рекомбинантного CD70 человека для выявления VHH к CD70*

[906] Отдельные колонии *E. coli* SS320, несущие моноклональные фагмиды, собирали в 96-луночные культуральные планшеты и выращивали в течение ночи при 37°C в шейкере-инкубаторе. На следующий день культуры восстанавливали до ~0,05 OD<sub>600</sub> в объеме 200 мкл и выращивали до середины логарифмической фазы роста (0,5<OD<sub>600</sub><0,8). В этот момент экспрессию VHH-his индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ. К культурам также добавляли детергент Triton X-100 до конечной концентрации 1% для облегчения секреции VHH-His в культуральный супернатант. Планшеты выращивали в течение ночи при 30°C в шейкере-инкубаторе. На следующий день планшеты центрифугировали и супернатант, содержащий секретируемый VHH-His, наносили на предварительно заблокированные планшеты для ELISA, покрытые 1 мкг/мл CD70 человека. Планшеты инкубировали в течение по меньшей мере 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали 3 раза PBST (PBS+0,01% Tween20), наносили вторичное антитело (анти-His-HRP) и планшеты инкубировали в течение дополнительных 30 минут при комнатной температуре. После 3-кратной промывки PBST на планшеты наносили субстрат TMB, и реакции давали протекать в течение 1-5 минут, после чего наносили 1М HCl в качестве стоп-раствора. Сразу же после нанесения стоп-раствора в каждой лунке на спектрофотометре измеряли

оптическую плотность при 450 нм ( $OD_{450}$ ). Лунки с  $OD_{450}$ , превышающей фоновый сигнал более чем в 3 раза, идентифицировали как положительные связывающие компоненты. Положительные связывающие компоненты были отправлены в Genewiz для секвенирования по Сэнгеру для идентификации последовательности VHH, а уникальные клоны были сохранены для определения дальнейших характеристик. Было идентифицировано по меньшей мере 87 различных связывающих компонентов. Последовательности этих связывающих компонентов представлены в таблице 5. Также были созданы гуманизированные версии R3P15F6, R3P3H12, R3aP3E8, R3aP9D10, и R3P5A1. Гуманизированные версии R3P15F6 имеют SEQ ID NO: 728-731.

[907] Гуманизированный R3P15F6

[908]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDKYAMGWFRQAPGKELEGVSCITSSSGVV  
YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAGPPDDCSVPGYYGLNY  
WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 728)

[909]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDKYAMGWFRQAPGKELEGVSCITSSSGVV  
YYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRPEDTAVYYCAAAGPPDDCSVPGYYGLNY  
WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 729)

[910]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDKYAMGWFRQAPGKELEGVSCITSSSGVV  
KYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRPEDTAVYYCAAAGPPDDCSVPGYYGLNY  
WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 730)

[911]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDKYAMGWFRQAPGKELEGVSCITSSSGVV  
KYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRPEDTAVYYCAAAGPPDDCSVPGYYGLNYW  
GQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 731)

[912] Гуманизированные версии R3P3H12 имеют SEQ ID NO: 732-734.

[913]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFDIVRMSWYRQAPGKQRELVSIITSGGATYYA  
DSVKGRFTISRDNKNAKLYLQMNSLRPEDTAVYYCNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO: 732)

[914]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFDIVRMSWYRQAPGNQRELVSIITSGGATYYA  
DSVKGRFTISRDNKNAKLYLQMNSLRPEDTAVYYCNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO: 733)

[915]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFDIVRMSWYRQAPGNQRELVSIITSGGATYYA  
DSVKGRFTISRDNKAWKALYLQMNSLRPEDTAVYYCNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO: 734)

[916] Гуманизированные версии R3aP3E8 имеют SEQ ID NO: 735-737.

[917]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLEHYMSWFRQAPGKDLEGVSCITSSGGIPY  
YADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCGAATPDDDCSVPGHYGLNYW  
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 735)

[918]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLEHYSMGWFRQAPGKDLEGVSCITSSGGIPY  
YADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCGAATPDDDCSVPGHYGLNYW  
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 736)

[919]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLEHYSMGWFRQAPGKDLEGVSCITSSGGIPK  
YADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCGAATPDDDCSVPGHYGLNYW  
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 737)

[920] Гуманизированные версии R3aP9D10 имеют SEQ ID NO: 738-740.

[921]

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAAPGFTFDAYAMSWFRQAPGKERE GVSCLSPSDGSTY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATPSWC SLKADFGSWGQGT  
LVTVSS (SEQ ID NO: 738)

[922]

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAAPGFTFDAYAMGWFRQAPGKERE GVSCLSPSDGST  
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATPSWC SLKADFGSWGQGT  
LVTVSS (SEQ ID NO: 739)

[923]

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAAPGFTFDAYAMGWFRQAPGKERE GVSCLSPSDGST  
YYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATPSWC SLKADFGSWGQGT  
LVTVSS (SEQ ID NO: 740)

[924] Гуманизированные версии R3P5A1 имеют SEQ ID NO: 741-743.

[925]

EVQLVES GGGLVQP GGSLRLS CAASGSIFSATRMSWYRQAPGKQRELVSIVTSGGRTYY  
ADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCKFER YDYVNYWGQGT  
LVTVSS (SEQ ID NO: 741)

[926]

EVQLVES GGGLVQP GGSLRLS CAASGSIFSATRM EWYRQAPGKQRELVSIVTSGGRTYY  
ADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCKFER YDYVNYWGQGT  
LVTVSS (SEQ ID NO: 742)

[927]

EVQLVES GGGLVQP GGSLRLS CAASGSIFSATRM EWYRQAPGKQRELVSIVTSGGRTYY  
ADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNNLRPEDTAVYYCKFER YDYVNYWGQGT  
LVTVSS (SEQ ID NO: 743)

**Пример 2: Характеристика наноантител к CD70**

*ELISA связывания клеток с уникальным VHH к CD70*

[928] Связывающие компоненты VHH R3P2G8, VHH R3P3H12, VHH R3aP9D10, VHH R3aP3E8, VHH R2P14A12 и VHH R3P5A1 были дополнительно охарактеризованы с помощью ELISA. *E. coli* SS320, несущие уникальные фагмиды с VHH, культивировали в течение ночи при 37°C в шейкере-инкубаторе. На следующий день культуры восстанавливали до ~0,05 OD600 в объеме 1-3 мл и выращивались до середины логарифмической фазы роста ( $0,5 < OD600 < 0,8$ ). В этот момент экспрессию VHH-his для секреции в периплазму *E. coli* индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 1 mM. Культуры выращивали в течение ночи при 30°C в шейкере-инкубаторе. На следующий день культуры центрифугировали, осадок сохраняли, а периплазматические белки экстрагировали с помощью BugBuster Master Mix (EMD Millipore, 71456) в соответствии с протоколом производителя. Белки VHH-his очищали из периплазматического экстракта с использованием магнитных частиц Ni-NTA (Promeaga, V8500) и протокола очистки от производителя. После очистки концентрацию белка VHH-his оценивали с помощью количественного определения белка по Бредфорду или с использованием BCA или с помощью измерения NanoDrop A280.

[929] Для определения того, могут ли VHH к CD70 распознавать антиген на клетках, проводили ELISA для связывания клеток. ~500 нМ каждого VHH-his разводили в блокирующем буфере (PBS+0,01% Tween20+2% обезжиренного сухого молока) и добавляли в лунки, содержащие 100000-200000 предварительно заблокированных клеток CHO-CD70 (высокая экспрессия CD70), клеток JVM3 (средне-низкая экспрессия CD70), клеток CHO дикого типа (отрицательный контроль), клеток HL60 (отрицательный контроль). Планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при перемешивании. После инкубации клетки промывали 3 раза путем центрифугирования и слива супернатанта с последующим добавлением PBST. Затем наносили вторичное антитело (анти-His-HRP) и смесь инкубировали в течение 30 минут. После еще 3 промывок на планшеты наносили субстрат TMB, и реакции давали протекать в течение 1-5 минут, после чего в качестве стоп-раствора наносили 1M HCl. Сразу же после нанесения стоп-раствора в каждой лунке на спектрофотометре измеряли оптическую плотность при 450 нм (OD<sub>450</sub>). Результаты показаны на Фиг. 1. Как показано, каждый из идентифицированных связывающих компонентов VHH R3P2G8, VHH R3P3H12, VHH R3aP9D10, VHH R3aP3E8, VHH R2P14A12 и VHH R3P5A1, в дополнение к связывающим компонентами scFv к CD70 1F6 и 41D12, показал самое высокое связывание с клетками CHO-CD70 (высокая экспрессия CD70) и незначительное связывание с клетками типа CHO (отрицательный контроль) и клетками HL60 (отрицательный контроль).

*Анализ связывания Octet*

[930] Биослойную интерферометрию использовали для измерения аффинности связывания CD70 с антителами 41D12, R3P3H12, R3P5A1, R3aP3E8 и R3aP9D10, нацеленными на CD70, и человеческим CD27, слитым с доменом Fc человека (CD27-Fc; Асго Biosystems, кат. CD7-h5254). Биотинилированный по N-концу CD70 (остатки 39-193)

(Acro Biosystems, кат. CDL-H82Q9) разводили в буфере Octet [PBS, содержащем 0,02% Tween20 (об./об.) и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (масс./об. )] до конечной концентрации 3 мкг/мл и иммобилизовали на стрептавидиновых биосенсорах Pall ForteBio Dip и Read<sup>TM</sup> (Pall ForteBio, кат. 185019) до конечной толщины биослоя 0,5-1,0 нм. После иммобилизации CD70 биосенсоры погружали в буфер Octet для удаления несвязанного биотинилированного CD70 и установления фиксированного базового сигнала сенсора. Затем биосенсоры, нагруженные CD70, переносили в буфер Octet, содержащий 400 нМ CD27-Fc или антитела к  $\alpha$ CD70, и ассоциацию отслеживали в течение 5 минут при 30°C при перемешивании со скоростью 1000 об/мин. Фрагмент scFv, полученный из гуманизированного антитела к  $\alpha$ CD70 ламы 41D12 и слитый с человеческим Fc (41D12-Fc), служил в качестве положительного контроля в отношении связывания CD70, верблюжье однодоменное антитело к ализциму (клон D2-L19) использовали в качестве отрицательного контроля. Диссоциацию CD27-Fc или антител к  $\alpha$ CD70 инициировали переносом сенсоров в буфер Octet и контролировали в течение 5 минут. Данные были проанализированы с использованием ForteBio Data Analysis Suite 9.0. Наблюдаемые скорости ассоциации ( $k_{on}$ ) и диссоциации ( $k_{off}$ ) для связывания однодоменных антител с CD70 определяли с использованием модели подгонки кривой 1:1, чтобы получить во всех случаях  $R^2 \geq 0,95$ . Значения равновесной константы диссоциации для связывания с CD70,  $K_D$ , определяли по соотношению  $k_{off}$  и  $k_{on}$ . Связывание 41D12-Fc и CD27-Fc было приспособлено к модели 2:1, чтобы учесть бивалентность слитых доменов Fc, и во всех случаях было достигнуто  $R^2 \geq 0,95$ .

[931] Результаты, показанные на Фиг. 2, демонстрируют высокую аффинность каждого из вновь созданных антител к CD70 в отношении CD70.

#### *Классификация эпитопов наноантител к CD70*

[932] Биослойную интерферометрию использовали для классификации эпитопных групп нацеленных на CD70 антител 1F6, 41D12, R3AP3E8, R3AP9D10, R3P3H12 и R3P5A1, и CD27 человека, слитых с доменом Fc человека (CD27-Fc; Acro Biosystems, кат. CD7-h5254) на основе парной конкуренции за связывание CD70. Все этапы проводили при 30 °C при перемешивании со скоростью 1000 об/мин. Биотинилированный по N-концу CD70 (остатки 39-193) (Acro Biosystems, кат. CDL-H82Q9) разводили в буфере Octet [PBS, содержащем 0,02% Tween20 (об./об.) и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (масс./об. )] до конечной концентрации 3 мкг/мл и иммобилизовали на стрептавидиновых биосенсорах Pall ForteBio Dip и Read<sup>TM</sup> (Pall ForteBio, кат. 185019) до конечной толщины биослоя 0,5-1,0 нм. Сенсоры с CD70 переносили в буфер Octet, чтобы установить стабильный базовый уровень после загрузки. Ассоциация и полное насыщение CD70 были достигнуты с использованием 400 нМ растворов At1, состоящих из отдельных VHH к  $\alpha$ CD70, отдельных слитых молекул Fc человека с фрагментами scFv у  $\alpha$ CD70 (41D12-Fc и 1F6-Fc) или CD27-Fc в буфере Octet. Эта стадия называется стадией насыщения. После этого биосенсоры с CD70 промывали в течение 10 секунд, используя буфер Octet, и биосенсоры переносили в буфер Octet, содержащий как 200 нМ того же антитела или

рецептора, которые использовались на стадии насыщения, так и отдельное Ат2 (VНН к  $\alpha$ CD70, scFv 41D12 и 1F6 или CD27-Fc) при 200 нМ в буфере Octet. Эта стадия называется стадией конкуренции. Все возможные идентичности Ат1 на стадии насыщения сравнивались со всеми возможными комбинациями Ат2 на стадии конкуренции.

[933] Пары для эпитоп-специфической сортировки идентифицировали на основании порога сигнала связывания CD70 для стадии конкуренции. Порог сигнала определяли как наибольший самоблокирующийся сигнал связывания CD70, наблюдаемый, когда один и то же связывающий компонент используется для стадий насыщения и конкуренции. Неконкурентные пары Ат1/Ат2 сортировали по уникальным эпитопным группам, когда ни Ат1, ни Ат2 не блокировали связывание CD70 во время стадии конкуренции и давали сигнал  $>$  порога самоблокировки. Конкурентные пары Ат1/Ат2 усиливали взаимную блокаду сигнала связывания CD70, генерируя значения  $\leq$  порога самоблокировки. Однонаправленные пары для эпитоп-специфической сортировки Ат1/Ат2 определяли как пары, демонстрирующие асимметричную конкуренцию за связывание CD70 на основе сравнительной аффинности антигена. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Pall ForteBio Data Analysis 9.0 для создания матрицы для сортировки эпитопов и идентификации пар попавших в одну группу, не попавших в одну группу и однонаправленных пар.

[934] Результаты, представленные в данном документе и показанные на Фиг. 3 демонстрируют, что каждое из антител к CD70 1F6, 41D12, R3AP3E8, R3AP9D10, R3P3H12 и R3P5A1 связывается вместе с одной и той же эпитопной областью CD70, и все антитела к CD70 связываются с CD27, за исключением R3P3H12. Антитело 41D12 демонстрирует однонаправленное смещение антитела 1F6. Как 41D12, так и 1F6 замещают или блокируют связывание CD27 и антител R3AP3E8, R3AP9D10, R3P3H12 и R3P5A1 с CD70.

#### *Анализ конкуренции CD27*

[935] Анализ конкуренции CD27 проводили путем приведения в контакт с антителами к CD70 (1F6, 4D12, R3P2G8, R3P3H12, R2P14A12, R3P15F6, R3aP9D10, R3aP4D6, R2P16D9 или R3P5A1)

[936] с прикрепленным к клеточной поверхности CD70, который экспрессируется клетками CHO, в различных конфигурациях с конкуренцией с CD27-Fc и без нее. Дизайн эксперимента показан на Фиг. 4. В первом случае каждое анти-CD70 или CD27Fc наносили непосредственно на клетки CHO без конкуренции друг с другом (без конкуренции). Во втором условии (прямая конкуренция) антитела к CD70 смешивали с CD27-Fc, а затем смесь наносили на клетки. В третьем условии клетки CHO сначала приводили в контакт с CD27-Fc (т.е. предварительно покрывали), промывали, а затем наносили смесь антител к CD70 и CD27-Fc. В четвертом условии клетки CHO сначала приводили в контакт с промытым антителом к CD70, а затем наносили смесь антител к CD70 и CD27-Fc. Затем измеряли сигнал связывания. Результаты, представленные на Фиг. 5 демонстрируют, что антитела к CD70 превосходят CD27 по связыванию с CD70 во всех

протестированных условиях.

### Пример 3: Конструкции TFP

[937] Конструкции TFP к CD70 были сконструированы путем клонирования фрагмента ДНК доменов V<sub>НН</sub> к CD70 (или доменов scFv), связанного с ДНК-фрагментом CD3 или TCR либо с помощью последовательности ДНК, кодирующей короткий линкер (SL): AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:692), либо длинный линкер (LL): AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:693), в вектор pLRPO. Для создания конструкций слитых белков можно использовать различные другие векторы. Примеры созданных конструкций TFP к CD70 включают цепь анти-CD70-линкер-человеческий CD3ε (включая внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домены), причем домен, связывающий антиген CD70, представляет собой scFv 1F6, scFv 41D12, V<sub>НН</sub> R3P2G8, V<sub>НН</sub> R3P3G1, V<sub>НН</sub> R3P3H12, V<sub>НН</sub> R2P14A12, V<sub>НН</sub> R3P15F6, V<sub>НН</sub> R3aP3E8, V<sub>НН</sub> R3aP9D10, V<sub>НН</sub> R3aP4D6, V<sub>НН</sub> R2P16D9, и V<sub>НН</sub> R3P5A1.

### *Источники субъединиц TCR*

[938] Все субъединицы комплекса человеческих Т-клеточных рецепторов (TCR) содержат внеклеточный домен и трансмембранный домен. Субъединицы CD3-эпсилон, CD3-дельта и CD3-гамма имеют внутриклеточный домен. Комплекс TCR человека содержит полипептид CD3-эпсилон, полипептид CD3-гамма, полипептид CD3-дельта и полипептид альфа-цепи TCR и полипептид бета-цепи TCR или полипептид дельта-цепи TCR и полипептид гамма-цепи TCR. TCR-альфа, TCR-бета, TCR-гамма и TCR-дельта рекрутируют полипептид CD3-дзета. Каноническую полипептидную последовательность CD3-эпсилон человека можно найти под каталожным номером Uniprot P07766. Каноническую полипептидную последовательность CD3-гамма человека можно найти под учетным номером Uniprot P09693. Каноническую полипептидную последовательность CD3-дельта человека можно найти под учетным номером Uniprot P043234. Каноническую полипептидную последовательность CD3-дзета человека можно найти под учетным номером Uniprot P20963. Каноническую последовательность альфа-цепи TCR человека можно найти под учетным номером Uniprot Q6ISU1. Каноническую последовательность С-области бета-цепи TCR человека можно найти под учетным номером Uniprot P01850, последовательность V-области бета-цепи TCR человека - под номером P04435.

[939] Каноническая последовательность полипептида CD3-эпсилон человека: MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPYRIRKGGQRDLYSGLNQRR (SEQ ID NO:694).

[940] Полипептидная последовательность зрелого CD3-эпсилон человека:

[941]

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPYRIRKGGQRDL

YSGLNQRRRI (SEQ ID NO: 1235)

[942] Сигнальный пептид CD3ε человека:

[943] MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQ (SEQ ID NO:695).

[944] Внеклеточный домен CD3ε человека:

[945]

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHL  
SLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD (SEQ ID NO:696).

[946] Трансмембранный домен CD3ε человека:

[947] VMSVATIVIVDICITGGLLLLVIYWS (SEQ ID NO:697).

[948] Внутриклеточный домен CD3ε человека:

[949]

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVNPDPYEPKRGQRDLYSGLNQRRRI  
(SEQ ID NO:698).

[950] Каноническая полипептидная последовательность CD3-гамма человека:  
MEQGKGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDG  
KMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATIS  
GFLFAEIVSIFVLA VGVYFIAGQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQ  
GNQLRRN (SEQ ID NO:699).

[951] Полипептидная последовательность зрелого CD3-гамма человека:

[952]

QSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGMIGFLTEDKKKWNLGSNAK  
DPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLA VGVYFIAG  
QDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO: 1265)

[953] Сигнальный пептид CD3γ человека:

[954] MEQGKGLAVLILAILLQGTLA (SEQ ID NO:700).

[955] Внеклеточный домен CD3γ человека:

[956]

QSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGMIGFLTEDKKKWNLGSNAK  
DPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATIS (SEQ ID NO:701).

[957] Трансмембранный домен CD3 γ человека:

[958] GFLFAEIVSIFVLA VGVYFIA (SEQ ID NO:702).

[959] Внутриклеточный домен CD3γ человека:

[960] GQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ  
ID NO:703).

[961] Каноническая полипептидная последовательность CD3-дельта человека:  
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFNVCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLG  
KRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLALG  
VFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNKS (SEQ ID  
NO:704).

[962] Полипептидная последовательность зрелого CD3-дельта человека:

[963]

FKIPIEELEDRVFNVCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDK  
ESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQA  
LLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNKS (SEQ ID NO:1266).

[964] Сигнальный пептид CD3 $\delta$  человека:

[965] MEHSTFLSGLVLATLLSQVSP (SEQ ID NO:705).

[966] Внеклеточный домен CD3 $\delta$  человека:

[967]

FKIPIEELEDRVFNVCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDK  
ESTVQVHYRMCQSCVELDPATVA (SEQ ID NO:706).

[968] Трансмембранный домен CD3 $\delta$  человека:

[969] GIIVTDVIATLLLALGVFCFA (SEQ ID NO:707).

[970] Внутриклеточный домен CD3 $\delta$  человека:

[971] GHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ  
ID NO:708).

[972] Каноническая полипептидная последовательность CD3-дзета человека:  
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADA  
PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPGEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDK  
MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID  
NO:709).

[973] Каноническая последовательность альфа-цепи TCR человека:  
MAGTWLLLLALGCPALPTGVGGTPFPSLAPPIMLLVDGKQMQMVVCLVLDVAPPGLD  
SPIWFSAGNGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGAEGHS  
RSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLRGTPGGALWLGVLRLLLFKLLFDLLTCSCLCDPA  
GPLSPATTTLRALGSHRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTPPGRKPGSPVWG  
EGSYLSSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGAFFAGDLPPPLQAGAA (SEQ ID NO:710).

[974] Каноническая последовательность константной области альфа-цепи TCR  
человека:

PNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNLFQNLSVIG  
FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:711).

[975] Последовательность человеческого IgC альфа-цепи TCR:

[976]

PNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNLFQNLS  
(SEQ ID NO: 712)

[977] Трансмембранный домен альфа-цепи TCR человека:

[978] VIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLW (SEQ ID NO:713).

[979] Внутриклеточный домен альфа-цепи TCR человека:

[980] SS

[981] Каноническая последовательность V-области CTL-L17 альфа-цепи TCR человека:

MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDY  
FLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAA  
K GAGTASKLTFGTGTRLQVTL (SEQ ID NO:714).

[982] Каноническая последовательность константной области (mTRAC) альфа-цепи TCR мыши:

[983]

XIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKS  
NGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNL SVMGLRIL  
LLKVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:1267).

[984] Каноническая последовательность C-области (константного домена) бета-цепи TCR человека:

EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTD  
PQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV  
TQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRK  
DF (SEQ ID NO:715).

[985] Последовательность человеческого IgC бета-цепи TCR человека:

[986]

EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTD  
PQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV  
TQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYE (SEQ ID NO: 716)

[987] Трансмембранный домен бета-цепи TCR человека:

[988] ILLGKATLYAVLVSALVLMAM (SEQ ID NO:717).

[989] Каноническая последовательность CTL-L17 V-области бета-цепи TCR человека:

MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPRHNITKRGQNVTFRCDPSEHNRLYWYRQT  
LGQGPEFLTYFQNEAQLKSRLSDRFS AERP KGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSLAG  
LNQPQHFGDGTRLSIL (SEQ ID NO:718).

[990] Внутриклеточный домен бета-цепи TCR человека:

[991] VKRKDF (SEQ ID NO: 719)

[992] Каноническая последовательность YT35 V-области бета-цепи TCR:  
MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTM  
MRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSFSTCS  
ANYGYTFGSGTRLTVV (SEQ ID NO:720).

[993] Каноническая последовательность константной области бета-цепи TCR мыши:

[994]

EDLRNVTTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVST  
DPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONI

SAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS  
(SEQ ID NO:1268)

[995] TCR $\gamma$ 9G115

[996]

AGHLEQPQISSTKTLTKTARLECVVSGITISATSVYWYRERPGEVIQFLVSISYDGTVRKE  
SGIPSGKFEVD RIPETSTSTLTIHNVEKQDIATYYCALWEAQQELGKKIKVFGPGTKLIITD  
KQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKIHWEKKSNTILGSQEGNT  
MKTNDTYMKFSWLTVP EKSLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFFPIKTDVITMDPKDNC  
SKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLLKSVVYFAITCCLLRRTAFCCNGEKS (SEQ ID  
NO:1269)

[997] Каноническая последовательность C-области (константного домена) гамма-  
цепи TCR человека:

[998]

DKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKIHWEKKSNTILGSQEGN  
TMKTNDTYMKFSWLTVP EKSLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFFPIKTDVITMDPKDN  
CSKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLLKSVVYFAITCCLLRRTAFCCNGEKS (SEQ ID  
NO:721).

[999] Последовательность IgC TCR-гамма человека:

[1000]

DKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKIHWEKKSNTILGSQEGN  
TMKTNDTYMKFSWLTVP EKSLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFFPIKTDVITMDPKDN  
CSKDANDTLLLQLTNTSA (SEQ ID NO: 722)

[1001] Трансмембранный домен гамма-цепи TCR человека:

[1002] YYMYLLLLLLKSVVYFAITCCLL (SEQ ID NO:723).

[1003] Внутриклеточный домен гамма-цепи TCR человека:

[1004] RRTAFCCNGEKS (SEQ ID NO: 724)

[1005] TCR $\delta$ 2c15

[1006]

MQRISLIHLSLFWAGVMSAIELVPEHQTVPV SIGVPA TLRC SMKGEAIGNYYINWYRKT  
QGNTMTFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDIAKNLAVLKILAPSERDEGSYYCACDALKRT  
DTD KLIFGKGTRVTVEPRSQPHTKPSVFVMKNGT NVACL VKEFY PKDIRINLVSSKKITE  
FDPAIVISPSGKYNAV KLGKYEDSNSVTCSVQH DNKTVHSTDFEVKTDSTDHV KPKETE  
NTKQPSKSCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID  
NO:1270)

[1007] Каноническая последовательность C-области дельта-цепи TCR человека:

[1008]

SQPHTKPSVFVMKNGT NVACL VKEFY PKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLG  
KYEDSNSVTCSVQH DNKTVHSTDFEVKTDSTDHV KPKETENTKQPSKSCHKPKAIVHTE  
KVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO:725).

[1009] Последовательность человеческого IgC TCR-дельта человека:

[1010]

SQPHTKPSVFMKNGTNAVCLVKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVKLG  
 KYEDSNSVTCSVQHDKNTVHSTDFEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSCCHKPKAIVHTE  
 KVNMMSLTV (SEQ ID NO: 726)

[1011] Трансмембранный домен дельта-цепи TCR человека:

[1012] LGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFF (SEQ ID NO:727).

[1013] Внутриклеточный домен дельта-цепи TCR человека:

[1014] L

### ***Векторы экспрессии TFP***

[1015] Предлагаются векторы экспрессии, которые включают промотор (эукариотический фактор элонгации 1 альфа (промотор EF1 $\alpha$ ), сигнальную последовательность для осуществления секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (ген бычьего гормона роста (BGH)), элемент, обеспечивающий эписомальную репликацию и репликацию у прокариот (например, с происхождением SV40 и ColE1 или другие, известные в данной области техники), и элементы для обеспечения селекции (ген резистентности к ампициллину и маркер зеоцина).

[1016] Конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP, клонировали в лентивирусный вектор экспрессии pLRPO, как описано выше. Лентивирусные векторы переноса TFP к CD70 использовали для получения геномного материала, упакованного в псевдотипированные лентивирусные частицы VSV-G. Клетки Expi293F суспендировали в среде FreeStyle (FS) и инкубировали при 37°C, 8% CO<sub>2</sub>, 150 об/мин в течение 1-3 часов. ДНК-плазмиду, плазмиду Gag/Pol, плазмиду Rev и плазмиду VSV-G разводили в среде FS. Затем PEIpro разбавляли средой FS и добавляли к смеси ДНК и среды. К этой смеси добавляют инкубированные клетки и инкубируют при 37°C, 8% CO<sub>2</sub>, 150 об/мин в течение 18-24 часов. На следующий день супернатант заменяли свежей средой, добавляли бутират натрия и инкубировали при 37°C в течение дополнительных 24 часов. Затем лентивирус, содержащий супернатант, собирали в стерильную коническую центрифужную пробирку с крышкой объемом 50 мл и помещали на лед. После центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 минут при 4°C очищенный супернатант фильтровали через стерильный фильтр 0,45 мкм с низким связыванием белков. Затем вирус концентрировали с помощью Lenti-X. Вирусный исходный препарат либо использовали для инфицирования немедленно, либо делили на аликвоты и хранили при -80°C для будущего применения.

### **Пример 4: Получение Т-клеток со слитым белком Т-клеточного рецептора**

#### *Активация, трансдукция и экспансия Т-клеток*

[1017] Т-клетки очищали из лейкопака здорового донора путем положительной селекции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток с помощью микрочастиц с CD4 и CD8 от Miltenyi Biotec. На 0-й день Т-клетки, свежесыведенные или размороженные из предварительно приготовленных замороженных флаконов, активировали с помощью MACS GMP T-cell TransAct (Miltenyi Biotec) в присутствии человеческого IL-7 и IL-15 (оба от Miltenyi

Biotech, высшая степень чистоты). В 1-й день активированные Т-клетки трансдуцировали лентивирусом, кодирующим CD70.TFP. На 4-й день клетки промывали, субкультивировали в свежей среде с цитокинами, а затем размножали до 10-го дня, добавляя свежую среду на 7-й и 9-й день. В каждый день субкультивирования клетки собирали, промывали и ресуспендировали в свежей цитокин-содержащей среде для поддержания клеточной суспензии на уровне  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл.

*Верификация экспрессии TFP методом окрашивания клеток*

[1018] После лентивирусной трансдукции экспрессию CD70.TFP трансдуцированными Т-клетками подтверждали с помощью проточной цитометрии с использованием метки CD70-Fc или антитела к VHH на 10-й день экспансии клеток. Т-клетки трижды промывали в PBS, а затем повторно суспендировали в PBS в количестве  $2 \times 10^5$  клеток на лунку. Для исключения мертвых клеток клетки инкубировали с LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain (Invitrogen) в течение 30 минут при 4°C в темноте. Затем клетки дважды промывали PBS и блокировали блокирующим реагентом FcR человека (Miltenyi Biosciences) в течение 20 минут. Затем клетки инкубировали с меткой CD70-Fc или антителом к VHH в течение 30 минут при 4°C в темноте. Затем клетки дважды промывали буфером для окрашивания (PBS с 2% FBS) и окрашивали FITC-конъюгированным антителом к Fc человека или FITC-конъюгированным стрептавидином для обнаружения метки CD70-Fc или анти-VHH, соответственно, в течение 20 минут при 4°C в темноте. Затем клетки дважды промывали и ресуспендировали в буфере для окрашивания (PBS с 2% FBS) и подвергали сбору данных на LSR Fortessa™-X20 (BD Biosciences) с использованием программного обеспечения FACS Diva. Экспрессию TFP анализировали с помощью FlowJo® (BD Biosciences) из живых Т-клеток (CD3+ живых клеток). Как показано на Фиг. 6, связывание метки CD70-Fc было обнаружено во всех Т-клетках, трансдуцированных CD70.TFP. Репрезентативные данные показаны для Т-клеток от одного донора. Связывание не было обнаружено в нетрансдуцированных клетках. Связывание антитела к VHH обнаруживали в Т-клетках, трансдуцированных CD70.TFP, имеющих связывающие компоненты VHH R3P2G8, VHH R3P3H12, VHH R3P15F6, VHH R3aP9D10, VHH R2P16D9 и VHH R3P5A1. Связывание не было обнаружено в нетрансдуцированных Т-клетках или в Т-клетках, трансдуцированных TFP, имеющими связывающие компоненты scFv 1F6, VHH R3aP3E8, VHH R2P14A12, VHH R3aP4D6 или связывающий компонент scFv к CD19.

Пример 5: Фенотипирование CD70.TFP-Т-клеток

[1019] Измеряли фенотипирование Т-клеток, трансдуцированных CD70.TFP. Т-клетки с CD70.TFP или нетрансдуцированные Т-клетки получали, как описано выше. На 10-й день экспансии собирали Т-клетки от трех доноров и охарактеризовали клетки с помощью проточной цитометрии. Соотношение CD4+ и CD8+ Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии с APC-Cy7 (для обнаружения CD4+) и PerCP-Cy5.5 (для обнаружения CD8+) в TFP- и TFP+ Т-клетках. Статус памяти Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии с BV786 (для обнаружения CD45RA) и BV421 (для

обнаружения CCR7) в TFP- и TFP+ CD4+ Т-клетках (Фиг. 8А-8С) и в TFP- и TFP+ CD8+ Т-клетках (Фиг.8D-8F). На Фиг. 9А-9D показано окрашивание CD27 против CD45RA в CD4+ и CD8+ Т-клетках. Как показано на Фиг. 8 и 9, TFP+ клетки демонстрируют более высокий уровень активации, чем TFP-отрицательные клетки, сохраняя при этом популяцию подобных наивным клеткам, что особенно заметно во фракции CD8+ TFP+ клеток. Т-клетки от 1 репрезентативного донора показаны для каждого графика FACS.

#### **Пример 6: Пролиферация CD70.TFP-Т-клеток**

[1020] Оценивали пролиферацию CD70.TFP-Т-клеток. CD70.TFP-Т-клетки с указанным доменом связывания смешивали с опухолевыми клетками-мишенями в указанном соотношении эффектор:клетка-мишень и измеряли пролиферацию. Используемые линии клеток-мишеней представляли собой клетки CHO-ДТ с отсутствием экспрессии CD70 и клетки ТНР-1 с высокой экспрессией CD70. На 10-й день TFP-Т-клетки оттаивали и выдерживали в среде TexMACS+3% сыворотки человека АВ+1% пенициллина/стрептомицина+12,5 нг/мл IL-7+12,5 нг/мл IL-15 в течение 24 часов при 37°C. После этого периода покоя Т-клетки дважды промывали PBS и инкубировали с 1 мкл красителя CellTrace Violet (восстановленного в соответствии с инструкциями производителя) на  $1 \times 10^6$  Т-клеток/мл в предварительно подогретом PBS в течение 20 минут на водяной бане при 37°C в защищенном от света месте. Реакцию останавливали содержащей сыворотку средой, такой как RPMI-1640+10% FBS (R10), инкубировали 5 мин и дважды промывали. Тем временем опухолевые клетки-мишени ресуспендировали в PBS в концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл и инкубировали в соотношении 1:1 с консервантом клеток Streck в течение 25 минут. Опухолевые клетки-мишени затем дважды промывали перед ресуспендированием в R10 при концентрации  $1 \times 10^5$  клеток/мл и аликвотами по 100 мкл на лунку в 96-луночном планшете. Окрашенные CellTrace CD70.TFP-Т-клетки затем ресуспендировали в R10 при концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл и добавляли в тот же 96-луночный планшет при соотношениях эффектор:мишень 9:1, 3:1 и 1:1. Все объемы лунок доводили до 200 мкл с помощью R10 перед инкубацией в течение 72 часов. Через 72 часа планшеты обрабатывали для анализа методом проточной цитометрии и измеряли СИФ (средняя интенсивность флуоресценции). Снижение СИФ свидетельствует о делении/пролиферации клеток. Как показано на Фиг. 10, показанные Т-клетки, экспрессирующие CD70.TFP, демонстрировали усиленную пролиферацию при контакте с экспрессирующими CD70 клетками ТНР-1 по сравнению с клетками CHO-ДТ.

#### **Пример 7: Анализ цитотоксичности на основе люциферазы**

[1021] Анализ цитотоксичности на основе люциферазы оценивает цитотоксичность TFP-Т-клеток путем косвенного измерения ферментативной активности люциферазы в оставшихся живых клетках-мишенях после совместного культивирования. CD70-положительные клетки ТНР-1 и CD70-отрицательные клетки K562 модифицировали для сверхэкспрессии люциферазы светлячка посредством трансдукции люциферазой светлячка, кодирующей лентивирус, с последующей селекцией с помощью антибиотиков для получения стабильной линии клеток.

[1022] Клетки-мишени высевали в количестве 10000 клеток на лунку на 96-луночный планшет. Трансдуцированные CD70.TFP или нетрансдуцированные Т-клетки добавляли к клеткам-мишеням в различных соотношениях эффектор-мишень (9:1, 3:1 или 1:1). Затем смесь клеток культивировали в течение 24 часов при температуре 37°C с 5% CO<sub>2</sub> перед измерением ферментной активности люциферазы в живых клетках-мишенях с помощью системы Bright-Glo® Luciferase Assay System (Promega®, кат. № E2610). Клетки центрифугировали в осадок и повторно суспендировали в среде, содержащей субстрат люциферазы. Затем рассчитывали процент гибели опухолевых клеток по следующей формуле: % цитотоксичности=100% x [1 - RLU (опухолевые клетки+Т-клетки) / RLU (опухолевые клетки)].

[1023] Как показано на Фиг. 11, для всех трех доноров, при обоих соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней, трансдуцированные CD70.TFP Т-клетки, имеющие каждый из антигенсвязывающих доменов scFv 1F6, VHH R3aP3E8, VHH R3aP9D10, R3P3H12 VHH и R3P5A1 VHH, от трех доноров продемонстрировали усиленную цитотоксичность по отношению к CD70-положительным клеткам ТНР-1 по сравнению с трансдуцированными CD70.TFP Т-клетками, совместно культивируемыми с CD70-отрицательными клетками-мишенями K562, или нетрансдуцированными контрольными Т-клетками, совместно культивируемыми либо с клетками ТНР-1, либо с клетками K562. Для каждого отношения эффектор:мишень, показанные справа налево, показаны клетки-мишени с нетрансдуцированными Т-клетками или CD70.TFP-Т-клетками, имеющими антигенсвязывающие домены scFv 1F6, VHH R3aP3E8, VHH R3aP9D10, VHH R3P3H12 и VHH R3P5A1.

#### **Пример 8: Измерение секреции цитокинов с помощью MSD**

[1024] Показателем активации и пролиферации эффекторных Т-клеток, связанных с распознаванием клеток, несущих родственный антиген, является продукция эффекторных цитокинов, таких как интерферон-гамма (IFN-γ), интерлейкин-2 (IL-2) и фактор некроза опухоли альфа (TNF-α).

[1025] Мишень-специфическую выработку цитокинов, включая IFN-γ, IL-2, TNF-α и GM-CSF, TFP-Т-клетками измеряли в супернатантах, собранных через 24 часа после совместного культивирования Т-клеток с CD70-положительными клетками ТНР-1 и CD70-отрицательными клетками-мишенями K562 с использованием анализов U-PLEX® Biomarker Group I (hu) (Meso Scale Diagnostics®, LLC, кат. №: K15067L-4).

[1026] Как показано на Фиг. 12А и 12В, повышенные уровни IFN-γ, IL-2, TNF-α и GM-CSF наблюдались в трансдуцированных CD70.TFP Т-клетках, имеющих каждый из антигенсвязывающих доменов scFv 1F6, VHH R3aP3E8, VHH R3aP9D10, VHH R3P3H12 и VHH R3P5A1 от трех доноров, совместно культивируемых с CD70-положительными клетками-мишенями ТНР-1, по сравнению с трансдуцированными CD70.TFP Т-клетками, совместно культивируемыми с CD70-отрицательными клетками-мишенями K562, или нетрансдуцированными контрольными Т-клетками, совместно культивируемыми с клетками ТНР-1 или K562. Для каждого соотношения эффектор:мишень для IFN-γ, IL-2 и

TNF- $\alpha$ , показанных слева направо, представляют собой клетки-мишени K562 с нетрансдуцированными Т-клетками или с CD70.TFP-Т-клетками, имеющими scFv 1F6, VHH R3aP3E8, VHH R3aP9D10, VHH R3P3H12 и VHH R3P5A1, и клетками-мишенями THP-1 с CD70.TFP Т-клетками, имеющими антигенсвязывающие домены scFv 1F6, VHH R3aP3E8, VHH R3aP9D10, VHH R3P3H12 и VHH R3P5A1. Для каждого соотношения эффектор:мишень для GM-CSF слева направо показаны клетки-мишени K562 с нетрансдуцированными Т-клетками или с CD70.TFP-Т-клетками, имеющими антигенсвязывающие домены scFv 1F6, VHH R3aP3E8, VHH R3aP9D10, VHH R3P3H12 и VHH R3P5A1, и клетки-мишени THP-1 с нетрансдуцированными Т-клетками или с CD70.TFP-Т-клетками, имеющими антигенсвязывающие домены scFv 1F6, VHH R3aP3E8, VHH R3aP9D10, VHH R3P3H12 и VHH R3P5A1.

**Пример 9. Слитый белок Т-клеточного рецептора. Т-клетки, полученные с использованием антитела CD70 и без него**

[1027] Активация, трансдукция и экспансия Т-клеток. Т-клетки очищали из лейкопака здорового донора путем положительной селекции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток с помощью микрочастиц с CD4 и CD8 от Miltenyi Biotech. На 0-й день Т-клетки, свежeweыделенные или размороженные из предварительно приготовленных замороженных флаконов, активировали с помощью MACS GMP T-cell TransAct (Miltenyi Biotech) в присутствии человеческого IL-7 и IL-15 (оба от Miltenyi Biotech, высшая степень чистоты). Клетки культивировали в отсутствие антитела к CD70 или в 5 мкМ анти-CD70 41D12. В 1-й день активированные Т-клетки трансдуцировали в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл лентивирусом, кодирующим CD70.TFP (имеющий связывающий домен VHH R3aP3E8, также помеченный в некоторых случаях как 70-001) или CD70.TFP с переключателем PD-1(PD-1)CD28. На 4-й день клетки промывали, субкультивировали в свежей среде с цитокинами и затем размножали до 10-го дня. Антитело 41D12 добавляли в концентрации 5,0 мкМ, если оно добавлялось изначально. Клетки субкультивировали на 7 и 9. В каждый день субкультивирования клетки собирали, промывали и ресуспендировали в свежей среде, содержащей цитокины, для поддержания клеточной суспензии на уровне  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл. 41D12 добавляли в концентрации 1,0 мкМ на 7-й день к клеткам, обработанным 41D12.

[1028] Экспансия показана на Фиг. 13. Экспансия клеток увеличивается в присутствии 41D12 для клеток, трансдуцированных каждым из TFP. На Фиг. 13 также показана повышенная жизнеспособность клеток, трансдуцированных каждым из TFP и размноженных в присутствии 41D12.

[1029] Верификация экспрессии TFP методом окрашивания клеток

[1030] После лентивирусной трансдукции экспрессию TFP трансдуцированными Т-клетками подтверждали с помощью проточной цитометрии с использованием антитела к VHH на 10-й день экспансии клеток. Т-клетки трижды промывали в PBS, а затем повторно суспендировали в PBS в количестве  $2 \times 10^5$  клеток на лунку. Для исключения мертвых клеток клетки инкубировали с LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain (Invitrogen) в

течение 30 минут при 4<sup>0</sup>С в темноте. Затем клетки дважды промывали PBS и блокировали блокирующим реагентом FcR человека (Miltenyi Biosciences) в течение 20 минут. Затем клетки инкубировали с конъюгированным с iFluor488 антителом к VHN (GenScript) и с конъюгированным с BV605 антителом к CD3 (Biolegend) в буфере BD Horizon Brilliant Stain (BD Biosciences) в течение 30 минут при 4<sup>0</sup>С в темноте. Затем клетки дважды промывали буфером для FACS (PBS с 2% FBS) и затем фиксировали в растворе PBS и 4% формальдегида в течение 20 мин при 4<sup>0</sup>С в темноте. Затем клетки дважды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS (PBS с 2% FBS) и подвергали сбору данных на LSR Fortessa™-X20 (BD Biosciences) с использованием программного обеспечения FACS Diva. Экспрессию TFP анализировали с помощью FlowJo® (BD Biosciences) из живых Т-клеток (CD3+ живых клеток). Как показано на Фиг. 14, связывание антитела к VHN было обнаружено во всех Т-клетках, трансдуцированных TFP, что указывает на экспрессию TFP на клеточной поверхности.

[1031] Фенотипирование TFP-Т-клеток

[1032] Фенотипирование Т-клеток, трансдуцированных TFP, оценивали с помощью проточной цитометрии и представляли графически. TFP-Т-клетки или нетрансдуцированные Т-клетки получали, как описано выше. На 10-й день экспансии Т-клетки собирали и клетки характеризовали с помощью проточной цитометрии с антителами, имеющими следующие метки. Соотношение CD4+ и CD8+ Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии с APC-Cy7 (для обнаружения CD4+) и PerCP-Cy5.5 (для обнаружения CD8+) (Фиг. 15). Состояние памяти Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии с BV786 (для обнаружения CD45RA) и BV421 (для обнаружения CCR7) в CD4+ Т-клетках (Фиг. 16А) и в CD8+ Т-клетках (Фиг. 16В). На Фиг. 17 показаны уровни CCR7. На Фиг. 18 показана доля CD69+ клеток (PECy7) в CD4+ и CD8+ Т-клетках. На Фиг. 19А и 19В показано окрашивание CD27 (APC) против CD70 (PE) в CD4+ и CD8+ Т-клетках.

[1033] Как показано на Фиг. 15, доля CD4+ и CD8+ клеток была сходной в TFP+ клетках, обработанных антителом к CD70, по сравнению с необработанными клетками.

[1034] Как показано на Фиг. 16А и 16В, CD70.TFP+ Т-клетки и CD70.TFP+ Т-клетки, имеющие переключатель PD-1, обработанные антителом к CD70, демонстрируют повышенный уровень подобных наивным клеткам и сниженный уровень TEMRA-клеток по сравнению с необработанными клетками как для CD4+, так и для CD8+ Т-клеток. Как показано на Фиг. 17, CD4+ и CD8+ CD70.TFP+ Т-клетки и CD70.TFP+ Т-клетки, имеющие переключатель PD-1, показали умеренное повышение уровней CCR7 при обработке антителом 41D12 по сравнению с необработанными клетками. Как показано на Фиг. 18, CD4+ и CD8+ CD70.TFP+ Т-клетки и CD70.TFP+ Т-клетки, имеющие переключатель PD-1, показали увеличение уровней CD69 при обработке антителом 41D12 по сравнению с необработанными клетками. Эти результаты предполагают, что обработка антителом к CD70 во время экспансии способствует формированию наивного фенотипа памяти или фенотипа центральной памяти в TFP+ Т-клетках.

[1035] На Фиг. 19А и 19В демонстрируют, что антитело блокирует обнаружение CD70 на клеточной поверхности нетрансдуцированных клеток и всех TFP+ Т-клеток, включая CD70.TFP+ Т-клетки с переключением PD-1 и без него.

[1036] Секвенирование РНК

[1037] Секвенирование РНК также проводили на клетках, приготовленных в соответствии с описанными в данном документе способами. РНК получали из CD70.TFP+ Т-клеток с переключателем PD-1 и без него, полученным в присутствии или в отсутствие антитела 41D12 после 10 дней экспансии. Результаты анализа показаны на Фиг. 20. Для CD70.TFP+ Т-клеток с переключателем PD-1 и без него наблюдается повышение экспрессии генов, участвующих в наивном/связанном с памятью фенотипе, и снижение экспрессии генов, участвующих в эффекторных/истощенных фенотипах, для клеток, полученных в присутствии антитела к CD70, по сравнению с клетками, полученными в отсутствие антитела к CD70.

[1038] Цитотоксичность и продукция цитокинов Т-клетками, полученными с помощью антитела к CD70

[1039] Анализ цитотоксичности на основе люциферазы оценивает цитотоксичность TFP-Т-клеток путем косвенного измерения ферментативной активности люциферазы в оставшихся живых клетках-мишенях после совместного культивирования. CD70-отрицательные клетки K562, CD70-положительные клетки AML THP-1 и CD70-положительные клетки RCC 786-О были модифицированы для сверхэкспрессии люциферазы светлячка посредством трансдукции люциферазой светлячка, кодирующей лентивирус, с последующей селекцией с помощью антибиотиков для получения стабильной линии клеток.

[1040] Клетки-мишени высевали в количестве 10000 клеток на лунку на 96-луночный планшет. Трансдуцированные TFP или нетрансдуцированные Т-клетки добавляли к клеткам-мишеням в различных соотношениях эффектор-мишень (9:1, 3:1 или 1:1). Затем смесь клеток культивировали в течение 24 или 72 часов (только в соотношении 1:1) при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> перед измерением ферментативной активности люциферазы в живых клетках-мишенях с помощью системы Luciferase Assay System Bright-Glo® (Promega®, кат. № E2610). Клетки центрифугировали в осадок и повторно суспендировали в среде, содержащей субстрат люциферазы. Затем рассчитывали процент гибели опухолевых клеток по следующей формуле: % цитотоксичности=100% x [1 - RLU (опухолевые клетки+Т-клетки) / RLU (опухолевые клетки)].

[1041] Как показано на Фиг. 21, после 24 часов совместного культивирования Т-клетки, трансдуцированные CD70.TFP, и клетки TFP, трансдуцированные CD70-TFP-переключателем PD-1, продемонстрировали повышенную цитотоксичность по отношению к CD70-положительным клеткам THP-1 и 786-О при экспансии в присутствии антитела к CD70 по отношению к клеткам, размножающимся в отсутствие антитела к CD70, особенно при соотношениях эффектор:клетки-мишени 3:1 и 1:1, что указывает на то, что обработка антителом к CD70 во время экспансии увеличивает цитотоксичность TFP+ Т-

клеток. Представленные в данном документе результаты могут указывать на то, что TFP+ Т-клетки имеет повышенную цитотоксичность из-за снижения уровня фратрицида во время образования CD70-TFP-Т-клеток.

[1042] Супернатанты получали из тех же анализов совместного культивирования через 24 часа или 72 часа для оценки продукции Т-клетками следующих цитокинов: GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL2 и TNF $\alpha$ . Продукцию цитокинов анализировали с использованием технологии Meso Scale Discovery (MesoScale Diagnostics, LLC) с анализами U-PLEX Biomarker Group I (hu) (кат. № K15067L-4).

[1043] Как показано на Фиг. 22А-22Н, Т-клетки, трансдуцированные CD70.TFP, и TFP-клетки, трансдуцированные CD70-TFP-переключателем PD-1, продемонстрировали повышенную продукцию GM-CSF, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  при экспансии в присутствии антитела к CD70 при контакте с CD70-экспрессирующими клетками ТНР-1 или 786-О через 24 и 72 часа по сравнению с необработанными клетками, за исключением временной точки 72 часа для клеток 786-О, которые приводили в контакт с TFP-клетками, трансдуцированными CD70-TFP-переключателем PD-1. Эти результаты демонстрируют, что обработка антителом к CD70 во время экспансии увеличивает продукцию цитокинов TFP+ Т-клетками при активации клеткой-мишенью. Представленные в данном документе результаты могут указывать на то, что TFP+ Т-клетки имеет повышенную цитотоксичность из-за снижения уровня фратрицида во время образования CD70-TFP-Т-клеток.

#### **Пример 10. Т-клетки со слитым белком Т-клеточного рецептора, нокаутные по CD70**

[1044] Активация, редактирование, трансдукция и экспансия Т-клеток

[1045] Т-клетки очищали из лейкопака здорового донора путем положительной селекции CD4+ и CD8+ Т-клеток с помощью микрочастиц с CD4 и CD8 от Miltenyi Biotec. На 0-й день Т-клетки, свежeweделенные или размороженные из предварительно приготовленных замороженных флаконов, активировали с помощью MACS GMP T-cell TransAct (Miltenyi Biotec) в присутствии человеческого IL-7 и IL-15 (оба от Miltenyi Biotec, высшая степень чистоты). На 1-й день активированные Т-клетки трансдуцировали в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл лентивирусом, кодирующим CD70.TFP. На 4-й день клетки промывали, субкультивировали в свежей среде с цитокинами, а затем размножали до 10-го дня, добавляя свежую среду на 7-й и 9-й день. В каждый день субкультивирования клетки собирали, промывали и ресуспендировали в свежей цитокин-содержащей среде для поддержания клеточной суспензии на уровне  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл.

[1046] Для клеток CD70 KO, отредактированных с помощью CRISPR, CD70 инактивировали в Т-клетках, описанных выше, в 1-й день (в тот же день, что и трансдукция). Рибонуклеопротеины (РНП) SpCas9, нацеленные на ген CD70, получали путем отжига sgРНК, нацеленной на CD70, с tracrРНК при молекулярном соотношении 1:1. Отожженные дуплексы смешивали с белком SpCas9 в молекулярном соотношении 1,5:1. 0,61 мкМ РНП смешивали с  $2,5 \times 10^6$  Т-клеток и подвергали электропорации в

соответствии с протоколом производителя для Neon Transfection System, электропорацию проводили при 1600 В, 10 мс, 3 импульса. Клетки немедленно переносили в теплую среду и инкубировали при 37°C, чтобы обеспечить экспансию отредактированных Т-клеток.

[1047] Проверка редактирования и экспрессии TFP путем окрашивания клеток

[1048] Эффективность редактирования оценивали путем измерения потери поверхностной экспрессии CD70 с помощью проточной цитометрии на 7 и 9 дни экспансии клеток с использованием PE-конъюгированного антитела к CD70 (Biolegend) и BV605-конъюгированного антитела к CD3 (Biolegend). Как показано на Фиг. 23А и 23В, небольшое количество CD70 было обнаружено на клеточной поверхности всех протестированных типов отредактированных клеток как на 7-й, так и на 9-й день.

[1049] Экспрессию TFP трансдуцированными Т-клетками подтверждали с помощью проточной цитометрии, как описано в Примере 9, на 10-й день экспансии клеток. Как показано на Фиг. 24, связывание антитела к VHN было обнаружено во всех Т-клетках, трансдуцированных TFP, что указывает на экспрессию TFP на клеточной поверхности, и эффективность трансдукции была сравнима между неотредактированными и отредактированными клетками.

[1050] Фенотипирование TFP-Т-клеток

[1051] Фенотипирование Т-клеток, трансдуцированных TFP, проводили, как описано выше в Примере 9. На 10-й день экспансии Т-клетки собирали и клетки характеризовали с помощью проточной цитометрии с антителами, имеющими следующие метки. Соотношение CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии с APC-Cy7 (для обнаружения CD4<sup>+</sup>) и PerCP-Cy5.5 (для обнаружения CD8<sup>+</sup>) (Фиг. 25). На Фиг. 26 показано окрашивание CD27 (APC) против CD70 (PE) в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках. Состояние памяти Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии с BV786 (для обнаружения CD45RA) и BV421 (для обнаружения CCR7) в CD4<sup>+</sup> Т-клетках (Фиг. 27А) и в CD8<sup>+</sup> Т-клетках (Фиг. 27В). На Фиг. 28 показано соотношение CD69<sup>+</sup> (PECy7) CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

[1052] Как показано на Фиг. 27А и 27В, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> CD70.TFP-Т-клетки, лишенные CD70, имеют более высокий уровень подобных наивным клеток и пониженный уровень TEMRA-клеток по сравнению с клетками, имеющими CD70 дикого типа. Как показано на Фиг. 28, CD4<sup>+</sup> CD70.TFP-Т-клетки и CD8<sup>+</sup> CD70.TFP-Т-клетки, лишенные CD70, имеют пониженные уровни CD69<sup>+</sup> клеток по сравнению с клетками, имеющими CD70 дикого типа. Эти результаты позволяют предположить, что нокаут CD70 способствует формированию наивного фенотипа у TFP<sup>+</sup> Т-клеток.

#### **Пример 11: Блокирование антителами CD70.TFP-Т-клеток**

[1053] Оценивали способность антитела к CD70 блокировать активность TFP к CD70. TFP 70-001 (P3E8) экспрессировался в клетках Jurkat ДТ или с нокаутом CD3ε. Экспрессию TFP к CD70 оценивали с помощью проточной цитометрии. Экспрессию TFP к CD70 определяли путем окрашивания меченым биотином CD70 или антителом к VHN (Фиг. 29). Клетки, экспрессирующие TFP к CD70, культивировали совместно с мишень-

экспрессирующими клетками в присутствии или в отсутствие антитела к CD70 для оценки способности антитела к CD70 блокировать активацию клеток, экспрессирующих TFP. Клетки, экспрессирующие TFP к CD70, совместно культивировали в соотношении 1:1 с CD70-отрицательными клетками K562, CD70-положительными клетками AML THP-1 или CD70-положительными клетками JVM3 в течение 16 часов в присутствии или в отсутствие 5 мкМ 41D12 антитела к CD70. Активацию TFP-T-клеток оценивали по экспрессии CD69. Клетки Jurkat дикого типа и клетки с нокаутом CD3ε, экспрессирующие TFP 70-001 (P3E8), демонстрировали повышенную экспрессию CD69 при контакте с экспрессирующими CD70 линиями клеток THP-1 или JVM3, и это увеличение активации T-клеток снижалось в присутствии антитела к CD70 (**Фиг. 30** и **Фиг. 31**). Увеличение экспрессии CD69, наблюдаемое в клетках, экспрессирующих TFP к CD70, при контакте с клетками-мишенями, экспрессирующими CD70, было больше для клеток-мишеней JVM3, чем для клеток-мишеней THP-1, и это согласуется с тем, что клетки-мишени JVM3 имеют более высокие уровни экспрессии CD70, чем клетки THP-1. Эксперимент повторили с тремя различными антителами к CD70, совместно культивируя нокаутные по CD3ε клетки Jurkat, экспрессирующие TFP к CD70, с CD70-отрицательными клетками K562, CD70-положительными клетками AML THP-1 и CD70-положительными клетками JVM3 в соотношении 1:1 в течение 16 часов в присутствии или отсутствии 5 мкМ антител к CD70 1F6-hFc или 70-001-hFc или 10 мкМ 41D12. Сходные результаты наблюдались с нокаутными по CD3ε клетками Jurkat, экспрессирующими TFP к CD70, демонстрирующими повышенную экспрессию CD69 при совместном культивировании с клетками-мишенями THP-1 или JVM3, которая была особенно выражена с клетками-мишенями JVM3. Это повышение было уменьшено добавлением любого из трех антител к CD70 к совместной культуре (**Фиг. 32** и **Фиг. 33**). Эти результаты свидетельствуют о том, что антитела к CD70 ингибируют зависимую от клетки-мишени индукцию экспрессии CD69 в клетках Jurkat, экспрессирующих TFP к CD70, опосредованную взаимодействием с CD70 на клетках-мишенях, и что степень блокады индукции CD69 антителами положительно коррелирует с экспрессией CD70 в клетках-мишенях.

#### **Пример 12. Получение антител scFv человека к CD70**

[1054] Человеческие антитела scFv, связывающие CD70, были получены путем пэннинга наивной человеческой библиотеки с внеклеточным доменом (aa39-193) CD70. Было выявлено 53 антитела. Способность CD27 блокировать связывание CD70 идентифицированными антителами измеряли с помощью ELISA с использованием двух разных анализов. В первом анализе CD27 и His-меченные связывающие CD70 компоненты scFv одновременно добавляли к CD70, связанному с поверхностью, а способность связывающих компонентов scFv связывать CD70 определяли с помощью анти-His-HRP. Во втором анализе CD70, связанный с планшетом, предварительно инкубировали с CD27 в течение 30 минут, а затем добавляли дополнительный CD27 и His-меченный связывающий CD70 компонент scFv. Способность связывающих компонентов scFv связывать CD70 определяли с помощью анти-His HRP. На **Фиг. 34** представлена

схема двух различных анализов блокирования CD27. Аффинность к CD70 также измеряли с помощью анализа методом ППР. Антитела scFv также тестировали на их способность связывать линии опухолевых клеток с высоким (CHO-CD70, JVM3 и U266) и низким уровнем (CHO-ДТ и К562) экспрессии CD70. Результаты для 39 антител показаны в **таблице 1** ниже.

Таблица 1: Характеристика человеческих антител scFv к CD70

ID	Анализ блокирования - 3 мкМ очищенного ScFv		1,25 мкг/мл очищенного scFv					Аффинность
	анти- His/Н RP	стреп/Н RP	CHO- CD70	СН О- дт	JVM- 3	К56 2	U266	
30-TC1.2-I-C08-1	1,833	1,501	502876	952	37430	2133	17386	6,73E-08
14-TC4-III-A04	2,813	0,359	609971	934	16992	2001	20385	1,37E-08
14-TC6-I-F03	2,468	0,954	33422	926	1882	2156	1430	2,89E-07
15-TC7-I-D07	2,502	1,454	270863,5	1002	50870, 5	2476	42930 ,5	1,75E-06
13-TC7-I-E11	2,286	1,418	531981	1025	80470	2254	32016	4,47E-08
<b>1-TC4-I-C10 (C10 или 1867)</b>	2,83	0,075	977726,5	873	73251	2000	48756	6,17E-09
16-TC4-I-C11	2,095	1,433	660352	969	10304 3	1974	51004	4,02E-08
4-TC4-I-G08	2,291	1,028	387163	945	33985	2114	23455	1,41E-06
<b>32-TC1.2-I- F07-6 (F07-6)</b>	2,423	0,113	553390	886	57255, 5	2129	20740	7,41E-09
<b>39-TC6-IV-B08 (B08 или 1885)</b>	2,973	0,268	52166,5	829	25288	1946	35857	2,89E-06
41-TC7-VII-A06	1,145	1,522	8936	821	1225	1835	1827	4,02E-06
37-TC7-VII-D05	2,279	0,655	111442	958	10983	1868	15862	5,64E-06
13-TC7-V-H10	1,97	1,378	601015,5	1116	87466	2018	34269	6,69E-08
60-TC7-VII-C02 (C02)	1,269	1,576	457505	930	10796	1938	5038	1,35E-07

53-TC7-VI-B06	1,382	1,439	12209	1062	1829	2397	1170	2,35E-07
<b>50-TC7-III-A11 (A11 или 1985)</b>	2,251	0,868	121682	799	12209	2099	44995	4,19E-06
47-TC7-III-D10	1,501	1,552	312525	878	34664	2130	18982	1,86E-08
62-TC7-V-D08	2,001	1,539	286252	909	45189	2346	35255	1,94E-07
<b>57-TC7-VII- A03 (A03)</b>	1,894	1,494	163394,5	1393	1642	4037	3150	8,53E-07
<b>61-TC7-IV-H08 (H08)</b>	0,711	1,525	64912	1684	1071	3331	947	3,32E-07
54-TC7-V-D10	1,464	1,172	240320,5	1929	2130	3082	1144	2,09E-07
38-TC7-V-G06	1,02	1,535	1344776, 5	1344	27391	2852	16935 ,5	1,82E-07
44-TC7-V-H07	1,661	1,49	511597	1222	1593	2641	1819	8,20E-06
22-TC7-VI-C03	1,915	1,459	246764	1811	5023	2493	2529	1,44E-06
56-TC7-VI-H08	1,505	1,44	295958	1651	2364	3031	6307	5,35E-07
40-TC7-VI-F11	1,843	1,369	234690	1922	4873	3319	11820	2,79E-07
46-TC7-VII-E11	2,278	1,265	76242	1671	1786	3258	2286	1,80E-07
51-TC7-VIII- G06	0,676	1,461	169887,5	1077	4255	2861	2143	5,32E-07
52-TC7-VIII- C02	1,563	0,533	430036	1059	8049	3059	2984	6,46E-08
55-TC4-IX-G04	1,243	1,282	87195	2236	3573	2591	2700	9,84E-07
42-TC4-VII-G08	2,341	1,106	364029	1686	33930	3188	13096	1,79E-07
35-TC6-VII-A09	0,639	1,485	1146331	1420	18809, 5	3183	16508 ,5	3,67E-07
43-TC4-VII-C04	1,812	1,442	722932	1048	44998, 5	3327	20038	6,99E-08
59-TC4-VII-F02	2,06	1,425	850162	1044	52141	3137	18505	1,01E-07
14-TC4-XIII- A01	1,739	1,463	111185,5	1829	1293	2973	953	2,83E-06
58-TC7-III-G11	1,974	0,503	276691,5	1931	14697	2224	12018	8,90E-06
49-TC4-XVI- F01	2,116	1,29	133959	1925	5407	3103	2978	1,06E-06
45-TC7-V-G04	2,153	0,926	416410	1450	41459,	2478	19718	7,87E-08

					5		,5	
36-TC6-VI-D04	1,533	1,513	977106	1393	11637, 5	2794	21256	1,19E-07

[1055] Титрование Octet выполняли для более полной характеристики аффинности трех антител scFv к CD70, 1885 (B08 выше), 1985 (A11 выше) и 1867 (C10 выше) к CD70 (**Фиг. 35**). Биотинилированный CD70 иммобилизовали на биосенсорах с SA и титровали указанным bHis-меченным scFv. Данные показывают хорошо аппроксимированные данные для n=1 для связывающих компонентов 1885 и 1985 и n=2 для связывающего компонента 1867. Данные имеют высокую аффинность и демонстрируют, что scFv связывают CD70 с аффинностью в диапазоне от 40 до около 55 нМ.

**Пример 13: Характеристика антител к CD70 в виде scFv и VHH**

[1056] Анализ эпитоп-специфической сортировки проводили на идентифицированных антителах scFv и VHH. Это было достигнуто путем иммобилизации биотина CD70 на биосенсорах с SA, предварительной загрузки CD70 данным антителом, а затем воздействия второго антитела на связанный антителом CD70 для обнаружения связывания. Показана схема анализа (**Фиг. 36**). Чтобы понять профиль сортировки scFv к CD70 1885 (B08 выше), 1985 (A11 выше) и 1867 (C10 выше), их сортировали против антител VHH с уникальным распределением по группам. Хотя все протестированные VHH сопоставляются с одной и той же общей областью эпитопа CD70, в экспериментах по сортировке их можно разделить на подгруппы в зависимости от того, насколько эффективно они конкурируют друг с другом, что может отражать тонкие различия в связывании. Для этого использовали VHH 70-001 и R3H12, а также 41d12 и рецептор CD70, CD27. Показанная матрица сортировки демонстрирует, что пары антител, отмеченные красными прямоугольниками, блокируют друг друга, и эти пары антител либо блокируют, либо замещают друг друга парным образом, и эти прямоугольники показаны желтым цветом (**Фиг. 36**). Все антитела принадлежат к одной и той же более крупной группе, полученной в процессе сортировки, но scFv 1985 (A11) можно отнести к категории наиболее сходных с VHH 70-001, 1867 (C10) находится в группе, который может быть вытеснен VHH 70-001 и 1885 (B08), а 1885 похож на 70-001, 1985 и 1867, но сильно превосходит другие связывающие компоненты в этой подгруппе. Эти данные демонстрируют, что все связывающие CD70 компоненты, включая 70-001, помещаются в 2 группы, и оба они выделены жирным шрифтом в показанной матрице для специфической сортировки. Обратите внимание, что желтый цвет означает однонаправленное смещение, темно-красный - блокировку, светло-красный - самоблокировку, а зеленый - связывание. Мы показали, что все связывающие компоненты связываются со всеми другими связывающими компонентами, но они могут быть разделены на 2 группы на основе блокирования CD27, потому что в то время как большинство связывающих компонентов блокируют связывание CD27 с CD70, VHH R3R3H12 этого не делает. Такое распределение по группам, по-видимому, связано со

структурными факторами и/или кинетикой связывания, а не просто аффинностью. График распределения групп слева группирует аффинно связанные связывающие вещества в отдельные узлы, а общие связывающие компоненты соединены стрелками. Направление стрелки указывает направление смещения от CD70 (**Фиг. 36**).

[1057] Затем было выполнено картирование эпитопов для подмножества антител к CD70 в виде V<sub>H</sub>H и scFv путем тестирования связывания антител с пептидами, имеющими аминокислотную последовательность в указанных положениях CD70. Было обнаружено, что все протестированные антитела связывают эпитоп HIQVTLAICSS **Фиг. 37**). Связывающий компонент C10 также связывало второй эпитоп ASRHHPTTLAVGICSPARSISL (SEQ ID NO: 1231).

#### **Пример 14. Конструкции TFP scFv**

[1058] Конструкции TFP scFv к CD70 человека были сконструированы путем клонирования фрагмента ДНК scFv к CD70, связанного с фрагментом ДНК CD3 или TCR, либо с помощью последовательности ДНК, кодирующей короткий линкер (SL): AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:692), либо длинный линкер (LL): AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:693), в лентивирусный вектор. Для создания конструкций слитых белков можно использовать различные другие векторы. Субъединицы TCR, которые можно использовать, описаны в **Примере 3** выше. Примеры созданных конструкций TFP к CD70 включают анти-CD70-линкер-цепь CD3ε человека (включая внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домены), при этом домен, связывающий антиген CD70, представляет собой любой из связывающих CD70 доменов scFv, приведенных ниже:

Таблица 2: Связывающие CD70 домены

<b>TC4-I-vLvH C10 (vLvH C10)</b>	<b>№1</b>
<b>TC7-VI-vLvH H08 (vLvH H08)</b>	<b>№2</b>
<b>TC7-VII-vLvH A03 (vLvH A03)</b>	<b>№3</b>
<b>TC7-III-vLvH A11 (vLvH A11)</b>	<b>№4</b>
<b>TC6-IV-vLvH B08 (vLvH B08)</b>	<b>№5</b>
<b>TC4-I-vHvL C10 (vHvL C10)</b>	<b>№6</b>
<b>TC7-VI-vHvL H08 (vHvL H08)</b>	<b>№7</b>
<b>TC7-VII-vHvL A03 (vHvL A03)</b>	<b>№8</b>
<b>TC7-III-vHvL A11(vHvL A11)</b>	<b>№9</b>
<b>TC6-IV-vHvL B08 (vHvL B08)</b>	<b>№10</b>

#### **Пример 15: Получение и характеристика клеток Jurkat со слитым белком T-клеточного рецептора**

[1059] Активация, трансдукция и экспансия клеток Jurkat

[1060] Клетки Jurkat, нокаутированные по CD3-эпсилон, получали путем нокаута субъединицы CD3ε в клетках Jurkat дикого типа (ДТ) с помощью технологии CRISPR, как

описано, например, в одновременно находящейся на рассмотрении патентной публикации США № 2017-0166622, и трансдуцировали TFP CD3ε, имеющими связывающие компоненты 1-10, показанные в **таблице 2** выше, а клетки размножали.

[1061] После экспансии экспрессию TFP в клетках Jurkat подтверждали на основании обнаружения экспрессии CD3 в клетках Jurkat с нокаутом CD3-эпсилон. Экспрессию CD69 также оценивали как маркер активации Т-клеток. Все конструкции показали высокую эффективность трансдукции. Было замечено, что экспрессия экспрессии TFP к CD70 увеличивала экспрессию CD69 (**Фиг. 38**).

[1062] Измерение активации клеток Jurkat

[1063] Опосредованную TFP к CD70 активацию клеток Jurkat, экспрессирующих конструкции TFP, оценивали путем совместного культивирования с CD70-отрицательными клетками K562, CD70-положительными клетками AML THP-1, CD70-положительными клетками ACHN и CD70-положительными клетками 786-O в течение 24 часов. Экспрессию CD69 оценивали с помощью проточной цитометрии. Как показано на **Фиг. 39**, клетки Jurkat, экспрессирующие TFP к CD70, демонстрировали повышенную экспрессию CD69 при совместном культивировании с линиями клеток, экспрессирующими CD70 (THP-1, ACHN или 786-O), по сравнению с совместным культивированием с клетками K562, которые не экспрессируют CD70.

[1064] Продукцию цитокинов также измеряли в том же эксперименте с совместным культивированием с использованием способов, описанных в **Примере 8**. Измеряли уровни TNF-α, GM-CSF и IL-2. Ни одна из клеток Jurkat не продуцировала обнаруживаемые уровни цитокинов при контакте с клетками K562, которые не экспрессируют CD70. Клетки Jurkat, трансдуцированные многими конструкциями TFP к CD70, экспрессировали уровни цитокинов выше, чем у нетрансдуцированных клеток при контакте с экспрессирующими CD70 линиями клеток THP-1, ACHN и 786-O (**Фиг. 40**).

**Пример 16. Получение и характеристика Т-клеток со слитым белком Т-клеточного рецептора**

[1065] Как описано выше, антиген клеточной поверхности CD70 представляет собой многообещающую мишень для иммунотерапии злокачественных новообразований из-за его селективной сверхэкспрессии при различных гематологических и солидных опухолях. Поскольку экспрессия CD70 в нормальных тканях происходит на активированных лимфоцитах, включая активированные Т-клетки, фратрицид (самоубийство) было признано серьезной проблемой для терапии на основе Т-клеток, нацеленной на CD70. Для решения этой задачи разнообразный пул полностью человеческих связывающих компонентов scFv к CD70, описанных выше, использовали для получения TFP-Т-клеток, а затем функционально исследовали на устойчивость к фратрициду *in vitro*. Были идентифицированы Т-клетки-кандидаты с TFP scFv к CD70, которые демонстрируют нормальную экспансию Т-клеток и улучшенный фенотип памяти (TFP C10), четко отличаясь от кандидатов, склонных к фратрициду, при этом сохраняя сильную цитотоксичность и продукцию цитокинов против опухолевых клеток,

экспрессирующих как низкий, так и высокий уровень CD70. Кроме того, Т-клетки с CD70 scFv к TFP продемонстрировали сильную противоопухолевую эффективность в моделях мышей с множественными ксенотрансплантатами (см. **Пример 21**) без признаков фратрицида *in vivo*. Таким образом, как показано ниже, была разработана терапия на основе Т-клеток с устойчивыми к фратрициду TFP к CD70, которая потенциально может лечить широкий спектр как гемобластозов, так и солидных злокачественных новообразований.

[1066] Т-клетки очищали от трех здоровых доноров, трансдуцировали TFP CD3ε, имеющими связывающие компоненты 1-10, указанные в **таблице 2** выше, TC-110 или TFP 70-001 CD3ε в соответствии со способами, описанными в **Примере 4**. Т-клетки, имеющие указанные TFP, активировали и размножали с помощью Human T cell TransAct (Miltenyi Biotech) с использованием рекомбинантных человеческих IL-7 и IL-15 в течение 10 дней. Экспансия Т-клеток для трех доноров показано на **Фиг. 41**. «Связывающий компонент с высоким риском к фратрициду» указывает на TFP 70-001. Кратность экспансии в конце производственного процесса для каждой тестируемой конструкции нормализовали к экспансии NT Т-клеток (n=3 донора).

[1067] После экспансии эффективность трансдукции оценивали с помощью проточной цитометрии. Эффективность трансдукции оценивали с помощью проточной цитометрии, обнаруживая поверхностную экспрессию связывающего CD70 компонента с использованием белка Fc-CD70. «Без фратрицида» указывает на TC-110, а «с высоким риском к фратрициду» указывает на TFP 70-001. 1-10 соответствуют TFP CD3ε, имеющим связывающие компоненты 1-10, приведенные в **таблице 2**. Как показано на **Фиг. 42**, высокая эффективность трансдукции была достигнута со всеми конструкциями TFP.

[1068] Фенотипирование TFP-Т-клеток

[1069] На 10-й день экспансии Т-клетки собирали и клетки характеризовали с помощью проточной цитометрии. Соотношение CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток для одного репрезентативного донора показано на **Фиг. 43**. Достоверных различий в соотношении CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток между конструкциями обнаружено не было. Активацию Т-клеток оценивали по поверхностной экспрессии CD69. Данные для одного репрезентативного донора показаны на **Фиг. 44**. Высокие уровни экспрессии CD69, наблюдаемые для некоторых TFP scFv (например, TFP TC7-VI-H08 vHvL), вероятно, указывают на активацию клеток вследствие цис-связывания TFP к CD70, аутоактивации и/или фратрицида. Дифференцировку Т-клеток определяли по поверхностной экспрессии CD45RA и CCR7 (наивные, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>; CM, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>; EM, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>; TEMRA, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>). Данные для одного репрезентативного донора показаны на **Фиг. 45**. Сохранение наивной популяции Т-клеток (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) наблюдали для нескольких TFP scFv, связывающих CD70, включая TC4-I-vLvH C10, TC6-IV-vLvH B08 и TC6-IV-vHvL B08. На **Фиг. 46** обобщены характеристики каждого из TFP scFv к CD70 человека.

[1070] Цитотоксичность и продукция цитокинов Т-клетками

[1071] Опосредованную TFP к CD70 активацию донорских Т-клеток, экспрессирующих конструкции TFP, оценивали путем оценки цитотоксичности и продукции цитокинов после совместного культивирования с CD70-отрицательными клетками K562, CD70-положительными клетками AML THP-1 и CD70-положительными клетками ACHN, а также CD70-положительными клетками 786-О. На **Фиг. 47** показана экспрессия CD70 линиями клеток THP-1, ACHN и 786-О, определенная с помощью проточной цитометрии.

[1072] Цитотоксичность измеряли, как описано в **Примере 7**. Т-клетки или контроли, экспрессирующие TFP к CD70, совместно культивировали с клетками, экспрессирующими люциферазу THP-1, ACHN, 786-О или K562, в соотношении 3:1, 1:1 или 1:3 в течение 24 часов. Затем измеряли активность люциферазы в живых клетках-мишенях и рассчитывали цитотоксичность, как описано выше. Данные для одного репрезентативного донора показаны на **Фиг. 48**. Как показано, Т-клетки, экспрессирующие многие TFP scFv к CD70, проявляли цитотоксичность по отношению к клеткам, экспрессирующим CD70, но не к клеткам K562, которые не экспрессируют CD70. В частности, TFP scFv, связывающие CD70, включая TC4-I-vLvH C10, TC7-VI-vLvH H08, TC7-III-vLvH A11, TC6-IV-vLvH B08, TC4-I-vHvL C10, TC7-VI-vHvL H08 и TC7-III-vHvL A11 проявляли высокие уровни цитотоксичности по отношению к экспрессирующим CD70 линиям клеток THP-1, ACHN и 786-О.

[1073] Продукцию цитокинов также измеряли в том же эксперименте с совместным культивированием с использованием способов, описанных в **Примере 8**. Были определены уровни IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF и IL-2. Репрезентативные данные для одного донора показаны на **Фиг. 49**. Т-клетки, экспрессирующие TFP scFv, связывающие CD70, включая TC4-I-vLvH C10, TC7-III-vLvH A11, TC4-I-vHvL C10 и TC7-III-vHvL A11, демонстрировали высокие уровни экспрессии IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF и IL-2 при совместном культивировании с экспрессирующими CD70 линиями клеток THP-1, ACHN и 786-О и не экспрессировали цитокины при совместном культивировании с клетками CD70-K562.

**Пример 17. Получение TFP к CD70 с гуманизированными связывающими доменами VHH**

[1074] Гуманизированные TFP VHH к CD70 были созданы путем гуманизации связывающего компонента 70-001 с получением гуманизированных антигенсвязывающих доменов VHH к CD70, имеющих SEQ ID NO: 1224-1227. Конструкции TFP к CD70 человека были сконструированы путем клонирования фрагмента ДНК VHH к CD70, связанного с фрагментом ДНК CD3 или TCR, либо с помощью последовательности ДНК, кодирующей короткий линкер (SL): AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:692), либо длинный линкер (LL): AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:693), в лентивирусный вектор. Для создания конструкций слитых белков можно использовать различные другие векторы. Субъединицы TCR, которые можно использовать, описаны в **Примере 3** выше. Данные, представленные в этом примере,

также включают данные для связывающих компонентов scFv человека TC1.2-I-F07-6 и TC7-VII-C02 из **Примера 12** выше.

[1075] Т-клетки были очищены от трех здоровых доноров, трансдуцированы TC-110 (анти-CD19 FMC63 с CD3ε), TFP CD3ε, имеющими связывающий компонент VHH 70-001 (P3E8), гуманизированные связывающие компоненты VHH h7, h8, h9 или h11, связывающие компоненты scFv человека TC1.2-I-F07-6 (F07-6), TC7-VII-C02 (C02) или TC4-I-C10 vLvH (C10) в соответствии со способами, описанными в **Примере 4**. Т-клетки, имеющие указанные TFP, активировали и размножали с помощью Human T cell TransAct (Miltenyi Biotech) с использованием рекомбинантных человеческих IL-7 и IL-15 в течение 10 дней. Экспансия Т-клеток для трех доноров для TFP, содержащих связывающие компоненты 70-001, h7, h8, h9, C02, F07-6, TC-110, и нетрансдуцированных клеток показано на **Фиг. 50**. Экспансия Т-клеток для трех доноров для TFP, содержащих связывающие компоненты 70-001, h9, h11, C10, и нетрансдуцированных клеток показано на **Фиг. 57**.

[1076] Верификация экспрессии TFP методом окрашивания клеток

[1077] После экспансии эффективность трансдукции оценивали с помощью проточной цитометрии. Для TFP, имеющих связывающие компоненты 70-001, h7, h8, h9, C02, F07-6 и TC-110, оценка эффективности трансдукции с помощью проточной цитометрии, определяющей поверхностную экспрессию связывающего CD70 компонента с использованием белка Fc-CD70, показана на **Фиг. 51**. Клетки, экспрессирующие TFP, имеющие все гуманизированные связывающие компоненты, показали высокую эффективность трансдукции, в то время как эффективность трансдукции была ниже для связывающих компонентов scFv человека C02 и F07-6. Для TFP, содержащих связывающие компоненты 70-001, h9 и h11, оценка эффективности трансдукции с помощью проточной цитометрии при обнаружении антитела к VHH показана на **Фиг. 58**. Сильная эффективность трансдукции наблюдалась для всех конструкций.

[1078] Фенотипирование TFP-Т-клеток

[1079] На 10-й день экспансии Т-клетки собирали и клетки характеризовали с помощью проточной цитометрии. Обнаружение CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток от трех доноров для Т-клеток, трансдуцированных TFP, имеющими связывающие компоненты 70-001, h7, h8, h9, C02, F07-6, TC-110, и нетрансдуцированных клеток показано на **Фиг. 52**. Обнаружение CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток от трех доноров для Т-клеток, трансдуцированных TFP, имеющими связывающие компоненты 70-001, h9, h11, и нетрансдуцированных клеток показано на **Фиг. 59**. В то время как соотношение CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> Т-клеток различалось между донорами, существенных различий между конструкциями не было. Дифференцировку Т-клеток определяли по поверхностной экспрессии CD45RA и CCR7 (наивные, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>; CM, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>; EM, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>; TEMRA, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>). Результаты для Т-клеток, экспрессирующих TFP, имеющие связывающие компоненты 70-001, h7, h8, h9, C02, F07-6, TC-110, и нетрансдуцированных клеток для двух доноров показаны на **фиг. 53**. Результаты для Т-клеток, экспрессирующих

TFP, имеющих связывающие компоненты 70-001, h9, h11, и нетрансдуцированных клеток для одного репрезентативного донора для CD3+ Т-клеток и для CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток показаны на **Фиг. 60**. Для связывающих компонентов 70-001, h7, h8, h9, C02, F07-6 и ТС-110 экспрессию CD69 на клеточной поверхности также измеряли как показатель активации клеток в клетках от трех доноров (**Фиг. 60**).

[1080] Цитотоксичность и продукция цитокинов Т-клетками

[1081] Опосредованную TFP к CD70 активацию донорских Т-клеток, экспрессирующих конструкции TFP, оценивали путем оценки цитотоксичности и продукции цитокинов после совместного культивирования с CD70-отрицательными клетками K562, CD70-положительными клетками AML THP-1 и CD70-положительными клетками ACHN, а также CD70-положительными клетками 786-О. Для TFP, содержащих связывающие компоненты 70-001 и C10, также оценивали Т-клетки, полученные в присутствии антитела к CD70 41D12, как описано в **Примере 9**, и также тестировали CD70-положительные клетки-мишени MOLM13. THP-1, ACHN и MOLM13 имеют умеренный уровень экспрессии, тогда как 786-О имеет высокий уровень экспрессии CD70.

[1082] Цитотоксичность измеряли, как описано в **Примере 7**. Т-клетки или контроли, экспрессирующие TFP к CD70, совместно культивировали с клетками, экспрессирующими люциферазу THP-1, ACHN, 786-О, MOLM13, или K562, в соотношении 3:1, 1:1 или 1:3 в течение 24 часов. Затем измеряли активность люциферазы в живых клетках-мишенях и рассчитывали цитотоксичность, как описано выше. Данные для одного репрезентативного донора для Т-клеток, экспрессирующих TFP, имеющих связывающие компоненты 70-001, h7, h8, h9, C02, F07-6, ТС-110, или нетрансдуцированных контролей показаны на **Фиг. 55**. Как показано, Т-клетки, экспрессирующие TFP 70-001, и каждый из гуманизированных TFP к CD70 (v7, v8 и v9) проявляли высокие уровни цитотоксичности по отношению к CD70-экспрессирующим клеткам THP-1, ACHN, 786-О, но не к клеткам K562, которые не экспрессируют CD70. Т-клетки, экспрессирующие TFP C02 и F07-6, проявляли умеренную цитотоксичность по отношению к экспрессирующим CD70 клеткам-мишеням, при этом F07-6 демонстрировал более высокую цитотоксичность, чем C02. Данные для одного репрезентативного донора для Т-клеток, экспрессирующих TFP, имеющие связывающие компоненты 70-001, h9, h11 и C10, полученных в отсутствие антитела 41D12, для Т-клеток, имеющих TFP 70-001 или C10, полученных в присутствии антитела 41D12, и для нетрансдуцированных клеток показано на **Фиг. 61**. Все клетки, экспрессирующие TFP, проявляли высокую цитотоксичность в отношении клеток-мишеней, экспрессирующих THP-1, ACHN, 786-О и MOLM 13 CD70, но не в отношении клеток K562, которые не экспрессируют CD70.

[1083] Продукцию цитокинов также измеряли в том же эксперименте с совместным культивированием с использованием способов, описанных в **Примере 8**. Были определены уровни IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF и IL-2. Данные для одного репрезентативного донора для Т-клеток, экспрессирующих TFP, имеющих связывающие компоненты 70-001,

h7, h8, h9, C02, F07-6, TC-110, или нетрансдуцированных контролей показаны на **Фиг. 56**. Как показано, Т-клетки, экспрессирующие TFP 70-001, и каждый из гуманизированных TFP к CD70 (h7, h8 и h9) демонстрировали высокие уровни продукции цитокинов в ответ на совместное культивирование с CD70-экспрессирующими клетками THP-1, ACHN, 786-O, хотя индукция экспрессии IL-2 в ответ на совместное культивирование с линией клеток ACHN была умеренной. Т-клетки, экспрессирующие TFP C02 и F07-6, демонстрировали умеренные уровни продукции цитокинов в ответ на совместное культивирование с экспрессирующими CD70 клетками-мишенями, при этом F07-6 демонстрировал более высокие уровни продукции цитокинов, чем C02.

[1084] Данные для одного репрезентативного донора для Т-клеток, экспрессирующих TFP, имеющие связывающие компоненты 70-001, h9, h11 или C10, полученных в отсутствие антитела 41D12, для Т-клеток, имеющих TFP 70-001 или C10, полученных в присутствии антитела 41D12, и для нетрансдуцированных клеток показаны на **Фиг. 62**. TFP C10, получаемый в присутствии или в отсутствие антитела 41D12, демонстрировал самые высокие уровни продукции цитокинов в ответ на совместное культивирование с экспрессирующими CD70 клетками THP-1, ACHN, 786-O и MOLM13. Т-клетки, экспрессирующие TFP, имеющие связывающие компоненты 70-001 (образованные в присутствии или в отсутствие антитела 41D12), h9 и h11, также продуцировали цитокины в ответ на совместное культивирование с CD70-экспрессирующими клетками THP-1, ACHN, 786-O, и MOLM13. Незначительное количество цитокинов продуцировалось любой из Т-клеток в ответ на совместное культивирование с клетками K562, которые не экспрессируют CD70.

**Пример 18: Получение TFP к CD70 с дополнительными слитыми белками**

[1085] Были сконструированы Т-клетки с TFP scFv C10 к CD70, которые дополнительно экспрессируют слитый белок PD-1-CD28 или связанный с мембраной IL15 (IL-15, слитый с IL15Ra с помощью гибкого линкера). TFP и слитый белок PD-1-CD28 или связанный с мембраной IL-15 экспрессируются в одной и той же открытой рамке считывания и отделяются от TFP саморасщепляющимся пептидом. Например, в некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1233, 1236, 1240 и 1264. В качестве еще одного примера, в некоторых вариантах осуществления конструкция экспрессии содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1233, 1236, 1240 или 1264. В качестве еще одного примера, в некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, перечисленных в таблице 12. В качестве еще одного примера, в некоторых вариантах осуществления конструкция экспрессии содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, перечисленных в таблице 12.

[1086] Т-клетки очищали и трансдуцировали в соответствии со способами,

описанными в **примере 4**. Т-клетки, имеющие указанные TFP, активировали и размножали с помощью Human T cell TransAct (Miltenyi Biotech) с использованием рекомбинантных человеческих IL-7 и IL-15 в течение 10 дней. Экспансия Т-клеток показана на **Фиг. 63**.

[1087] Верификация экспрессии TFP методом окрашивания клеток

[1088] На 10-й день экспансии Т-клетки собирали и клетки характеризовали с помощью проточной цитометрии. Оценивали эффективность трансдукции. Результаты показаны на **Фиг. 64**. Также измеряли поверхностную экспрессию IL-15Ra и PD-1. Все конструкции показали высокую эффективность трансдукции. PD-1 обнаруживали на поверхности клеток, трансфицированных TFP C10 к CD70 и слитым белком PD-1-CD28. IL15Ra обнаруживали на поверхности клеток TFP C10 к CD70 и связанного с мембраной IL15.

[1089] Фенотипирование TFP-Т-клеток

[1090] Обнаружение CD4<sup>+</sup> Т-клеток в клетках, трансдуцированных TFP C10, TFP C10 со слитым белком PD-1-CD28 или TFP C10 со связанным с мембраной IL15, показано на **Фиг. 65**. Дифференцировку Т-клеток определяли по поверхностной экспрессии CD45RA и CCR7 (наивные, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>; CM, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>; EM, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>; TEMRA, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) в CD3<sup>+</sup> Т-клетках, CD4<sup>+</sup> Т-клетках и CD8<sup>+</sup> Т-клетках. Результаты на **Фиг. 66** показано, что клетки, экспрессирующие TFP C10 со связанным с мембраной IL15, демонстрируют повышенную долю наивных Т-клеток по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими TFP к CD10.

#### **Пример 19. Получение дополнительных антител scFv человека к CD70**

[1091] Для получения дополнительных человеческих антител scFv к CD70 гуманизированных мышей Alloy иммунизировали CD70. Мышей с положительным титром отбирали для отбора тканей и получали гибридомы. Антитела, продуцируемые гибридомами, подвергали скринингу на связывание с экспрессирующими CD70 линиями клеток и на их способность связывать CD70 в присутствии CD27. Связывание клеток-мишеней показано ниже в **таблице 3**. Данные аффинности для CD70 согласно Octet показаны ниже в **таблице 4**.

Таблица 3. Связывание антител к CD70, получаемых мышами Alloy, с +/- CD70 линиями клеток

<b>ID клона</b>	<b>JVM-3</b>	<b>U266</b>	<b>Raji</b>	<b>K562</b>
13G6	479127	389366	144309	22536
9A11	409751	350647	145354	20160
9A1	401270	323782	139100	18525
11D12	353818	306554	125692	20555
8A2	341674	308824	123451	21799
4G7	322210	310389	102521	20538
6G10	303949	276010	83578	18366

15F8	234044	213098	85113	19117
1F6	224807	239393	68904	19006
1E3	120616	105681	38830	19242
9E4	89158	101943	43978	18818
8G10	87796	110928	22595	19114
6D7	81339	68485	28131	18723
13C1	80692	72601	32844	18075
13C9	73281	68926	27474	18737
12D1	72128	93313	32849	19215
1G12	68236	64672	23855	18271
6G3	67173	57329	25411	18128
2F1	31565	30551	12101	18079
6E6	27639	26373	24366	18845
3B6	27217	18532	12401	18840
1H7	26867	18714	13064	19269
4C4	20560	17115	10242	18346
10G5	18895	23738	10704	17701
14A5	15315	15157	9178	19025
11G10	14091	12868	9201	18574
10E12	10663	10408	8212	18643
3B12	9841	8919	7877	18736
11G12	9584	9302	7690	18414
2B11	9299	8955	7546	18187
13G5	9186	8347	7886	21322
7A5	9184	8197	7960	18615
13C2	9141	8128	8289	18607
8G6	8966	8554	8067	19580
9B2	8936	8045	7312	18770
1F12	8900	7973	7780	19431
15C10	8794	8127	8189	18115
15A11	8698	7576	7800	18365
14G6	8683	7733	7944	18234
14C1	8487	7519	8073	18523
15D1	8454	7795	7000	17511

14C9	8244	7407	7719	18210
1A8	7992	7561	7323	16845

Таблица 4: Данные о связывании согласно Octet для антител к CD70, вырабатываемых мышами Alloy

ID клона	*Конц. IgG (мкг/мл)	Взаимодействие CD27:CD70, Нейтрализация связывания мкАт**	CD70 (100nM)				
			Ответ	KD (M)	ka (1/M*c)	kdis (1/c)	R^2
11D12	37,9	0,0506	0,4464	3,74E-12	8,03E+04	3,01E-07	0,999
13G6	27,1	0,0585	0,4092	3,42E-12	9,64E+04	3,30E-07	0,998
9A11 (9A11E8)	34,7	0,0777	0,4286	2,46E-12	1,37E+05	3,36E-07	0,9951
15F8 (15F8D8)	19,9	0,0349	0,3823	4,81E-12	6,98E+04	3,36E-07	0,9913
4C4	Слишком низкая	Н.О.	0,0239	3,72E-12	9,17E+04	3,41E-07	0,8453
8G10	Слишком низкая	Н.О.	0,0986	3,90E-12	9,52E+04	3,71E-07	0,9892
6D7	45,0	0,0729	0,3942	3,22E-12	1,16E+05	3,73E-07	0,9942
1G12	45,7	0,0788	0,4521	2,84E-12	1,32E+05	3,75E-07	0,9973
12D1	5,5	0,0198	0,3196	4,07E-12	9,24E+04	3,76E-07	0,9955
6E6	27,4	0,0582	0,4553	3,35E-12	1,15E+05	3,83E-07	0,9937
13C1 (13C1G6)	42,6	0,0595	0,4155	5,00E-12	7,82E+04	3,91E-07	0,9976
6G3	31,5	0,0711	0,4166	3,24E-12	1,25E+05	4,06E-07	0,9964
1H7	50,1	0,0779	0,5111	2,93E-12	1,47E+05	4,31E-07	0,994
8A2	38,9	0,0562	0,5189	4,19E-12	1,05E+05	4,38E-07	0,9981
13C9	33,1	0,0548	0,4156	5,10E-12	9,05E+04	4,62E-07	0,9987

9E4	23,5	0,0363	0,4291	3,32E-12	1,47E+05	4,88E-07	0,9888
10G5	Слишком низкая	Н.О.	0,0183	4,29E-12	1,14E+05	4,88E-07	0,536
9A1 (9A1H6)	36,0	0,0553	0,4337	6,03E-12	8,75E+04	5,28E-07	0,9992
1E3 (1E3D9)	66,2	0,1019	0,5058	2,55E-10	1,52E+05	3,88E-05	0,9963
мышиний анти- CD70	10,5	0,0124	0,4891	4,36E-10	9,37E+04	4,09E-05	0,9992
4G7 (4G7E8)	16,3	0,0429	0,3573	1,28E-09	1,30E+05	1,67E-04	0,9972
2F1 (2F1F7)	37,1	0,0275	0,6976	6,60E-09	8,41E+04	5,55E-04	0,9991
1F6	Слишком низкая	Н.О.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.	Н.С.
* «Слишком низкая» указывает на концентрацию IgG в супернатанте менее 3 мкг/мл							
** Значение менее 0,04 указывает на возможную нейтрализацию связывания мкАт							

[1092] Антитела 9A11, 15F8, 13C1, 9A1, 1E3, 4G7 и 2F1 с высокой аффинностью к CD70 были клонированы в формат scFv в ориентации vLvH и vHvL для получения антител scFv VH VL 15F8D8, VL VH 15F8D9, VH VL 9A11E8, VL VH 9A11E8, VH VL, 9A1H6, VL VH 9A1H6, VH VL 4G7E8, VL VH 4G7E8, VH VL 2F1F7, VL VH 2F1F7, VH VL 1E3D9, VL VH 1E3D9, VH VL1 13C1G6, VL1 VH 13C1G6, VH VL2 13C1G6, и VL2 VH 13C1G6.

#### **Пример 20: Дополнительные конструкции TFP scFv**

[1093] Конструкции TFP scFv к CD70 человека были сконструированы путем клонирования фрагмента ДНК scFv к CD70, связанного с фрагментом ДНК CD3 или TCR, либо с помощью последовательности ДНК, кодирующей короткий линкер (SL): AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:692), либо длинный линкер (LL): AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:693), в лентивирусный вектор. Для создания конструкций слитых белков можно использовать различные другие векторы. Субъединицы TCR, которые можно использовать, описаны в **Примере 3** выше. Примеры созданных конструкций TFP к CD70 включают анти-CD70-линкер- цепь CD3ε человека с доменом, связывающим антиген CD70, представляющим собой vHvL 1E3D9, vLvH 2F1F7, vLvH 9A11E8, vLvH 13C1G6, vLvH 13G6E8 или vLvH 15F8D8.

[1094] Т-клетки от двух доноров очищали и трансдуцировали TFP scFv человека, описанными выше, или TFP C10 в соответствии со способами, описанными в **Примере 4**.

Т-клетки, имеющие указанные TFP, активировали и размножали с помощью Human T cell TransAct (Miltenyi Biotech) с использованием рекомбинантных человеческих IL-7 и IL-15 в течение 10 дней. Экспансия Т-клеток показана на **Фиг. 67**.

[1095] Верификация экспрессии TFP методом окрашивания клеток

[1096] На 10-й день экспансии Т-клетки собирали и клетки характеризовали с помощью проточной цитометрии. Эффективность трансдукции оценивали с помощью антитела к Fab. Также была определена положительность по CD8. Результаты для двух доноров показаны на **Фиг. 68**. Все конструкции показали высокую эффективность трансдукции.

[1097] Фенотипирование TFP-Т-клеток

[1098] Экспрессию CD70 на поверхности трансдуцированных Т-клеток измеряли у двух доноров. Экспрессию CD8 также измеряли для оценки доли CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток, экспрессирующих CD70. Т-клетки, трансдуцированные TFP C10, TFP vLvH 9A11E8, TFP vLvH 13G6E8 и TFP vHvL 15F8D8, имели очень низкие уровни клеток, экспрессирующих CD70, по сравнению с нетрансдуцированными контролями (**Фиг. 69**).

[1099] Дифференцировку Т-клеток определяли по поверхностной экспрессии CD45RA и CCR7 в CD4<sup>+</sup> Т-клетках и CD8<sup>+</sup> Т-клетках двух доноров (наивные, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>; CM, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>; EM, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>; TEMRA, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>). Результаты показаны на **Фиг. 70**.

[1100] Цитотоксичность Т-клеток

[1101] Опосредованную ТFP к CD70 активацию донорских Т-клеток, экспрессирующих конструкции TFP, оценивали путем оценки цитотоксичности после совместного культивирования с CD70-отрицательными клетками K562, CD70-положительными клетками AML THP-1 и CD70-положительными клетками ACHN, а также CD70-положительными клетками 786-О.

[1102] Цитотоксичность измеряли, как описано в **Примере 7**. Т-клетки или контроли, экспрессирующие TFP к CD70, совместно культивировали с клетками, экспрессирующими люциферазу THP-1, ACHN, 786-О или K562, в соотношении 3:1, 1:1 или 1:3 в течение 24 часов. Затем измеряли активность люциферазы в живых клетках-мишенях и рассчитывали цитотоксичность, как описано выше. Данные для двух доноров показаны на **Фиг. 71**. Как показано, Т-клетки, экспрессирующие TFP C10, TFP vLvH 9A11E8, TFP vLvH 13G6E8 и TFP vHvL 15F8D8, проявляли цитотоксичность в отношении клеток, экспрессирующих CD70, но не в отношении клеток K562, которые не экспрессируют CD70.

#### **Пример 21. Эффективность TFP к CD70 в условиях in vivo**

[1103] Мышиная модель RCC

[1104] Противоопухолевую эффективность in vivo экспрессирующих CD70.TFP-Т-клеток с переключателем PD-1 или без него, получаемых в присутствии или в отсутствие антитела к CD70, как описано выше, оценивали в модели подкожной почечно-клеточной карциноме человека, 786-О, у мышей NSG.

[1105] Мышам NSG подкожно инъецировали  $3 \times 10^6$  клеток 786-O-luc (200 мкл) в бок. Через восемнадцать дней после имплантации опухоли, когда объем опухоли у мышей составлял 100-150 мм<sup>3</sup>, мышей распределяли по группам эффективности (N=5) таким образом, чтобы каждая группа имела одинаковый средний объем опухоли (+/- 10%). Мышам внутривенно вводили  $3 \times 10^6$  Т-клеток с TFP к CD70 (с переключателем PD-1 или без него) или  $\sim 3,3 \times 10^6$  общих Т-клеток (NT). Группе мышей, которые получали носитель, давали носитель RPMI. День введения тестируемого препарата был днем исследования 0. Объемы опухолей определяли с помощью штангенциркуля 2 раза в неделю.

[1106] Как показано на **Фиг. 72А**, мыши, получавшие лечение Т-клетками с TFP 70-001 к CD70 (с переключателем PD-1 или без него), полученные в присутствии антитела к CD70, и мыши, получавшие лечение Т-клетками с TFP С10 к CD70 (полученными в отсутствие антитела к CD70), резко уменьшал объем опухоли по сравнению с мышами, получавшими лечение Т-клетками с TFP 70-001 к CD70, полученными в отсутствие антитела к CD70, и по сравнению с мышами, получавшими носитель или нетрансдуцированные Т-клетки.

[1107] Затем на 43-й день исследования мышей без опухолей повторно заражали  $3 \times 10^6$  клеток 786-О (подкожно) на животное. Наивным мышам, не получавшим лечения, в качестве контроля вводили опухолевые клетки. Результаты показаны на **Фиг. 72В**. У мышей, получавших любой из TFP к CD70, по-прежнему наблюдалось уменьшение объема опухоли по сравнению с контрольными мышами. Результаты демонстрируют, что TFP-Т-клетки, нацеленные на CD70, демонстрируют мощную и постоянную эффективность *in vivo*.

[1108] Мышиная модель системной лимфомы Беркитта человека на основе Raji

[1109] Противоопухолевую эффективность *in vivo* CD70.TFP-экспрессирующих Т-клетки с переключателем PD-1 или без него, получаемым в присутствии или в отсутствие антитела к CD70, как описано выше, оценивали на мышинной модели системной лимфомы Беркитта человека на основе Raji.

[1110] Мышам NSG внутривенно в хвостовую вену вводили  $5 \times 10^5$  клеток Raji-luc в 100 мкл. Через четыре дня после имплантации опухоли, когда у мышей наблюдали люминесценцию всего тела 5-7eb, мышей распределяли по группам эффективности (N=5) таким образом, чтобы средний объем опухоли в группе был одинаковым. Мышам внутривенно вводили  $2 \times 10^6$  Т-клеток с TFP к CD70 (с переключателем PD-1 или без него) или  $\sim 3,3 \times 10^6$  общих Т-клеток (NT). Группе мышей, которые получали носитель, давали носитель RPMI. День введения тестируемого препарата был днем исследования 0. Рост опухоли определяли с помощью биолюминесцентной визуализации всего тела IVIS два раза в неделю.

[1111] Как показано на **Фиг. 73**, мыши, получавшие лечение Т-клетками с TFP 70-001 к CD70 или клетками с TFP С10 к CD70, уменьшали объем опухоли по сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками. Клетки с TFP к 70-001 (с переключателем PD-1 или без него), полученные в присутствии антитела к CD70, имели резко уменьшенный объем

опухоли по сравнению с мышами, получавшими Т-клетки с TFP к CD70, полученные в отсутствие антитела к CD70, и по сравнению с мышами, получавшими носитель или нетрансдуцированные Т-клетки.

[1112] Мышиная модель системного острого миелоидного лейкоза человека на основе MOLM-13

[1113] Противоопухолевую эффективность *in vivo* экспрессирующих CD70.TFP Т-клетки, полученные в присутствии или в отсутствие антитела к CD70, как описано выше, оценивали на мышиной модели системного острого миелоидного лейкоза человека на основе MOLM-13.

[1114] Мышам NSG вводили внутривенно  $5 \times 10^4$  клеток MOLM-13-Luc. Четыре дня спустя, когда у мышей наблюдается люминесценция всего тела  $5 \times 10^6$ - $9 \times 10^6$ , в день исследования 0, мыши, имеющие опухоли, получали однократные инфузии указанных TFP-Т-клеток в/в. Отдельным животным вводили  $5 \times 10^6$  или  $1 \times 10^7$  TRuС-Т-клеток или  $\sim 1,7 \times 10^7$  общих Т-клеток (NT). N=5 мышей/группа. Группа мышей, получавших носитель, давали носитель RPMI. Рост опухоли определяли с помощью биолюминесцентной визуализации всего тела IVIS два раза в неделю.

[1115] Как показано на **Фиг. 74**, мыши, получавшие лечение Т-клетками с TFP 70-001 к CD70 или клетками с TFP C10 к CD70, уменьшали объем опухоли по сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками. Уменьшение объема опухоли было особенно выраженным при использовании  $1 \times 10^7$  TRuС-Т-клеток, независимо от того, образовывались ли TFP-Т-клетки в присутствии или в отсутствие антитела 41D12.

[1116] Мышиная модель карциномы почки на основе ACHN

[1117] Противоопухолевую эффективность *in vivo* экспрессирующих CD70.TFP Т-клетки, полученные в присутствии или в отсутствие антитела к CD70, как описано выше, оценивали на модели подкожной почечно-клеточной карциномы человека на основе ACHN у мышей NSG.

[1118] Мышам NSG подкожно инъецировали  $2 \times 10^6$  клеток ACHN-luc в 200 мкл с матригелем 1:1 в бок. Через двенадцать дней после имплантации опухоли, когда объем опухоли у мышей составлял  $\sim 150$  мм<sup>3</sup> (50-200 мм<sup>3</sup>), мышей распределяли по группам эффективности (N=5) таким образом, чтобы средний объем опухоли в группе был одинаковым (+/- 10%). Оставшихся мышей разделили на вспомогательные когорты (N=6 для контрольной группы, получавшей носитель, NT) таким образом, чтобы каждая группа имела одинаковый средний объем опухоли (+/- 10%). Мышам внутривенно вводили  $5 \times 10^6$  Т-клеток с TFP к CD70 или  $\sim 7 \times 10^6$  общих Т-клеток (NT). Группе мышей, которые получали носитель, давали носитель RPMI. День введения тестируемого препарата был днем исследования 0. Объемы опухолей определяли с помощью штангенциркуля 2 раза в неделю.

[1119] Как показано на **Фиг. 75**, мыши, получавшие лечение Т-клетками с TFP 70-001 к CD70 или клетками с TFP C10 к CD70, полученными в присутствии или в отсутствие антитела 41D12, резко уменьшали объем опухоли по сравнению с

нетрансдуцированными Т-клетками.

#### ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[1120] Изложенное выше раскрытие может охватывать несколько отдельных изобретений с независимой полезностью. Хотя каждое из этих изобретений было раскрыто в его предпочтительной(-ых) форме(-ах), конкретные варианты его осуществления, раскрытые и проиллюстрированные в данном документе, не следует рассматривать в ограничительном смысле, поскольку возможны многочисленные варианты. Объект изобретения включает все новые и неочевидные комбинации и подкомбинации различных элементов, признаков, функций и/или свойств, раскрытых в данном документе. В нижеследующей формуле изобретения, в частности, указываются определенные комбинации и подкомбинации, рассматриваемые как новые и неочевидные. Изобретения, воплощенные в других комбинациях и подкомбинациях признаков, функций, элементов и/или свойств, могут быть заявлены в этой заявке, в заявках, заявляющих приоритет этой заявки, или в родственных заявках. Такие пункты формулы изобретения, независимо от того, направлены ли они на другое изобретение или на одно и то же изобретение, а также являются ли они более широкими, узкими, равными или отличными по объему по сравнению с первоначальными пунктами формулы изобретения, также считаются включенными в объект настоящего изобретения.

#### ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[1121] Ниже приведены иллюстративные примеры аспектов и комбинации аспектов вышеупомянутых вариантов осуществления и примеров:

1. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), отличающаяся тем, что TFP содержит:

(a) субъединицу TCR, содержащую:

- (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и
- (ii) трансмембранный домен TCR,
- (iii) внутриклеточный домен TCR и

(b) антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD70; и

где субъединица TCR и антигенсвязывающий домен функционально связаны.

2. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1, отличающаяся тем, что TFP функционально взаимодействует с эндогенным комплексом TCR при экспрессии в Т-клетке.

3. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по вариантам осуществления 1 или 2, отличающаяся тем, что внутриклеточный домен TCR содержит стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3-гамма, CD3-дельта или CD3-эпсилон.

4. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-3, отличающаяся тем, что Т-клетка, экспрессирующая TFP, проявляет повышенную цитотоксичность по отношению к клетке человека, экспрессирующей CD70,

по сравнению с Т-клеткой, не содержащей TFP.

5. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-4, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.

6. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 5, отличающаяся тем, что длина линкера составляет 120 аминокислот или менее.

7. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 5, отличающаяся тем, что линкерная последовательность содержит  $(G_4S)_n$ , где G представляет собой глицин, S представляет собой серин, а n представляет собой целое число от 1 до 10.

8. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 7, отличающаяся тем, что n представляет собой целое число от 1 до 4.

9. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-8, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из одной и той же субъединицы TCR.

10. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из TCR-альфа.

11. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из TCR-бета.

12. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из TCR-гамма.

13. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из TCR-дельта.

14. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из CD3-эпсилон.

15. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из CD3-дельта.

16. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из CD3-гамма.

17. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов

осуществления 9-16, отличающаяся тем, что все три из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из одной и той же субъединицы TCR.

18. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-17, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой верблюжье антитело или его связывающий фрагмент.

19. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-17, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой мышьеантитело или его связывающий фрагмент.

20. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-17, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой человеческое или гуманизированное антитело или его связывающий фрагмент.

21. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-20, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) или однодоменное антитело (sdAb).

22. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-21, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело (sdAb).

23. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 22, отличающаяся тем, что sdAb представляет собой  $V_{HH}$ .

24. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-23, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен связывается с CD70 человека со значением  $K_D$  100 нМ или менее или от около 0,001 нМ до около 100 нМ.

25. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-24, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен не конкурирует с CD27 за связывание с CD70, не ингибирует взаимодействие CD70 с CD27 и/или не связывается с тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27.

26. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-24, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен конкурирует с CD27 за связывание с CD70, ингибирует взаимодействие CD70 с CD27 и/или связывается с тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27.

27. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-26, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен содержит переменный домен, содержащий определяющую комплементарную область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3.

28. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 27, отличающаяся тем, что CDR1, CDR2 и CDR3 выбраны из группы, состоящей из:

CDR1, содержащей последовательность  $X_1X_2FX_3IX_4RGX_5$ ;

CDR2, содержащей последовательность AIX<sub>6</sub>TSGX<sub>7</sub>ATX<sub>8</sub>YA; и  
 CDR3, содержащей последовательность CNMEX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>YRX<sub>14</sub>YW;  
 CDR1, содержащей последовательность X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>YX<sub>20</sub>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>;  
 CDR2, содержащей последовательность X<sub>23</sub>CX<sub>24</sub>X<sub>25</sub>SX<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub>KYA; и  
 CDR3, содержащей последовательность CX<sub>31</sub>AAX<sub>32</sub>PX<sub>33</sub>DDCSVX<sub>34</sub>GX<sub>35</sub>YGLNYW;  
 CDR1, содержащей последовательность X<sub>36</sub>TFDAYAIG;  
 CDR2, содержащей последовательность ICLSPSDGSTYYA; и  
 CDR3, содержащей последовательность CAX<sub>37</sub>PSWCSLKADFGSW;  
 CDR1, содержащей последовательность SIIRDNVMA;  
 CDR2, содержащей последовательность AIINX<sub>38</sub>GGSX<sub>39</sub>NVD; и  
 CDR3, содержащей последовательность CNVYYRX<sub>40</sub>LW;  
 CDR1, содержащей последовательность SIFSIARMN или FTLDYAIA;  
 CDR2, содержащей последовательность AILNRAGRDTYA; и  
 CDR3, содержащей последовательность CNLQTISYHDFW; и  
 CDR1, содержащей последовательность SIFSATRME;  
 CDR2, содержащей последовательность AIVTSGGRTNYA; и  
 CDR3, содержащей последовательность CKFERYDYVNYW;

где X<sub>1</sub>-X<sub>39</sub> представляют собой любую природную аминокислоту.

28, отличающаяся тем, что:

X<sub>4</sub> представляет собой неполярную аминокислоту;  
 X<sub>5</sub> представляет собой полярную аминокислоту;  
 X<sub>6</sub> представляет собой неполярную аминокислоту;  
 X<sub>11</sub> представляет собой полярную аминокислоту;  
 X<sub>12</sub> представляет собой неполярную аминокислоту;  
 X<sub>16</sub> представляет собой полярную аминокислоту;  
 X<sub>18</sub> представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту;  
 X<sub>21</sub> представляет собой неполярную аминокислоту;  
 X<sub>24</sub> представляет собой неполярную аминокислоту;  
 X<sub>25</sub> представляет собой полярную аминокислоту;  
 X<sub>29</sub> представляет собой неполярную аминокислоту; и/или  
 X<sub>39</sub> представляет собой неполярную аминокислоту.

30. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 28 или 29, отличающаяся тем, что:

CDR1 содержит последовательность X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>FX<sub>3</sub>IX<sub>4</sub>RGX<sub>5</sub>,  
 где X<sub>1</sub> представляет собой S или G; X<sub>2</sub> представляет собой I или T; X<sub>3</sub> представляет собой D или G; X<sub>4</sub> представляет собой V или A; и X<sub>5</sub> представляет собой S или N;  
 CDR2 содержит последовательность AIX<sub>6</sub>TSGX<sub>7</sub>ATX<sub>8</sub>YA,  
 где X<sub>8</sub> представляет собой I или V; X<sub>9</sub> представляет собой G или D; и X<sub>10</sub> представляет собой N или D; и

CDR3 содержит последовательность CNMEX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>YRX<sub>14</sub>YW,

где X<sub>11</sub> представляет собой S или T; X<sub>12</sub> представляет собой F, V, или L; X<sub>13</sub> представляет собой R или S; и X<sub>14</sub> представляет собой N или H;

CDR1 содержит последовательность X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>YX<sub>20</sub>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>,

где X<sub>15</sub> представляет собой F, L, или R; X<sub>16</sub> представляет собой T, S, или N; X<sub>17</sub> представляет собой L, F, или R; X<sub>18</sub> представляет собой D или E; X<sub>19</sub> представляет собой R, H, Y, K, N; X<sub>20</sub> представляет собой S, A, или T; X<sub>21</sub> представляет собой I, V, или M; и X<sub>22</sub> представляет собой G или N;

CDR2 содержит последовательность X<sub>23</sub>CX<sub>24</sub>X<sub>25</sub>SX<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub>KYA,

где X<sub>23</sub> представляет собой S, A, T, или L; X<sub>24</sub> представляет собой I или V; X<sub>25</sub> представляет собой S или T; X<sub>26</sub> представляет собой S, K, или N; X<sub>27</sub> представляет собой G или S; X<sub>28</sub> представляет собой G или D; X<sub>29</sub> представляет собой I, L, или V; и X<sub>30</sub> представляет собой P, T, I, или V; и

CDR3 содержит последовательность CX<sub>31</sub>AAX<sub>32</sub>PX<sub>33</sub>DDCSVX<sub>34</sub>GX<sub>35</sub>YGLNYW,

где X<sub>31</sub> представляет собой G, T, или A; X<sub>32</sub> представляет собой T, G, или D; X<sub>33</sub> представляет собой D, P, A, или K; X<sub>34</sub> представляет собой P, A, или H; и X<sub>35</sub> представляет собой H или Y;

CDR1 содержит последовательность X<sub>36</sub>TFDAYAIG,

где X<sub>36</sub> представляет собой F или H;

CDR2, содержащую последовательность ICLSPSDGSTYYA; и

CDR3, содержащую последовательность CAX<sub>37</sub>PSWCSLKADFGSW,

где X<sub>37</sub> представляет собой T или A; или

CDR1 представляет собой SIIRDNVMA;

CDR2 содержит последовательность AINX<sub>38</sub>GGSX<sub>39</sub>NVD,

где X<sub>38</sub> представляет собой T или I; и X<sub>39</sub> представляет собой A или G; и

CDR3 содержит последовательность CNVYYRX<sub>40</sub>LW,

где X<sub>40</sub> представляет собой D или G.

31. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-30, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен содержит переменный домен, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 603-620 или 622-688.

32. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 31, отличающаяся тем, что переменный домен имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 603-620 или 622-688.

33. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 32, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 603-620 или 622-688.

34. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 33, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 605.

35. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 33, отличающаяся тем, что вариабельный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 611.

36. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 33, отличающаяся тем, что вариабельный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 613.

37. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 33, отличающаяся тем, что вариабельный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 620.

38. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 33, отличающаяся тем, что вариабельный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 618.

39. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 33, отличающаяся тем, что вариабельный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 603.

40. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 33, отличающаяся тем, что вариабельный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 615.

41. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 33, отличающаяся тем, что вариабельный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 608.

42. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 33, отличающаяся тем, что вариабельный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 610.

43. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 28-42, отличающаяся тем, что

(i) CDR1 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 87-104 или 107-172;

(ii) CDR2 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 259-276 или 279-344; и

(iii) CDR3 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 431-448 или 451-516.

44. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 28-43, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 89, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 261 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 433.

45. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 28-43, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 95, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 267 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 439.

46. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 28-43, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 97, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 269 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 441.

47. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 28-43, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 104, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 276 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 448.

48. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 28-43, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 102, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 274 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 446.

49. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 28-43, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 87, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 259 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 431.

50. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 28-43, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 99, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 271 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 443.

51. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 28-43, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 92, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 264 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 436.

52. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 28-43, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 94, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 266 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 439.

53. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-28, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен содержит переменный домен, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 621.

54. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 53, отличающаяся тем, что переменный домен имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 621.

55. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 54, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 621.

56. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 28 или 53-55, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 105, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 227 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 449.

57. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-21, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

58. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 57, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835.

59. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления

57, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835.

60. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 57, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 783-835.

61. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 57-60, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047.

62. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 57-60, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047.

63. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 57-60, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен легкой цепи (VL), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 995-1047.

64. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 58-63, отличающаяся тем, что домен VH содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDRH1), имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 836-888, CDRH2, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 889-941, и CDRH3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 942-994.

65. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 58-64, отличающаяся тем, что домен VL содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDRL1), имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1048-1100, CDRL2, имеющую последовательность любую из SEQ ID NO: 1101-1153, и CDRL3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1154-1206.

66. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 57-65, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800.

67. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 57-65, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800.

68. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 57-65, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 800.

69. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 66-68, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012.

70. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов

осуществления 66-68, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012.

71. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 66-68, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1012.

72. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 66-71, отличающаяся тем, что домен VH содержит CDRH1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 853, CDRH2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 906, и CDRH3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 959.

73. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 66-72, отличающаяся тем, что домен VL содержит CDRL1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1065, CDRL2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1118, и CDRL3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1171.

74. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 57-65, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 783.

75. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 57-65, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 783.

76. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 57-65, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 783.

77. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 74-76, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 995.

78. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 74-76, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 995.

79. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 74-76, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий последовательность SEQ ID NO: 995.

80. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 74-79, отличающаяся тем, что домен VH содержит CDRH1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 836, CDRH2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 889, и CDRH3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 942.

81. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 74-80, отличающаяся тем, что домен VL содержит CDRL1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1048, CDRL2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1101, и CDRL3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1154.

82. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов

осуществления 57-65, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 784.

83. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 57-65, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 784.

84. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 57-65, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 784.

85. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 82-84, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 996.

86. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 82-84, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 996.

87. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 82-84, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий последовательность SEQ ID NO: 996.

88. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 82-87, отличающаяся тем, что домен VH содержит CDRH1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 837, CDRH2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 890, и CDRH3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 943.

89. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 82-88, отличающаяся тем, что домен VL содержит CDRL1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1049, CDRL2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1102, и CDRL3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1155.

90. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 57-89, отличающаяся тем, что scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 782.

91. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-90, отличающаяся тем, что Т-клетка, экспрессирующая TFP, ингибирует рост опухоли при экспрессии в Т-клетке.

92. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-90, отличающаяся тем, что Т-клетка, экспрессирующая TFP, имеет повышенный фратрицид по сравнению с TFP, имеющим другой антигенсвязывающий домен.

93. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-90, отличающаяся тем, что Т-клетка, экспрессирующая TFP, имеет пониженный уровень фратрицид по сравнению с TFP, имеющим другой антигенсвязывающий домен.

94. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая

последовательность, кодирующую антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с CD70.

95. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 94, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой верблюжье антитело или его связывающий фрагмент.

96. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 94, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой мышьиное, человеческое или гуманизированное антитело или его связывающий фрагмент.

97. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 94-96, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) или однодоменное антитело (sdAb).

98. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 97, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой однодоменное антитело (sdAb).

99. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 98, отличающаяся тем, что sdAb представляет собой  $V_{HH}$ .

100. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 94-99, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела связывается с CD70 человека со значением  $K_D$  100 нМ или менее или от около 0,001 нМ до около 100 нМ.

101. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 94-100, отличающаяся тем, что указанное антитело или фрагмент антитела не конкурирует с CD27 за связывание с CD70, не ингибирует взаимодействие CD70 с CD27 и/или не связывается с одним и тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27.

102. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 94-100, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела конкурирует с CD27 за связывание с CD70, ингибирует взаимодействие CD70 с CD27 и/или связывается с тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27.

103. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 94-102, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела содержат переменный домен, содержащий определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3.

104. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 103, отличающаяся тем, что CDR1, CDR2 и CDR3 выбраны из группы, состоящей из:

CDR1, содержащей последовательность  $X_1X_2FX_3IX_4RGX_5$ ;

CDR2, содержащей последовательность  $AIX_6TSGX_7ATX_8YA$ ; и

CDR3, содержащей последовательность  $CNMEX_{11}X_{12}X_{13}YRX_{14}YW$ ;

CDR1, содержащей последовательность  $X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}YX_{20}X_{21}X_{22}$ :

CDR2, содержащей последовательность  $X_{23}CX_{24}X_{25}SX_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}KYA$ ; и  
 CDR3, содержащей последовательность  $CX_{31}AAX_{32}PX_{33}DDCSVX_{34}GX_{35}YGLNYW$ ;  
 CDR1, содержащей последовательность  $X_{36}TFDAYAIG$ ;  
 CDR2, содержащей последовательность  $ICLSPSDGSTYYA$ ; и  
 CDR3, содержащей последовательность  $CAX_{37}PSWCSLKADFGSW$ ;  
 CDR1, содержащей последовательность  $SIIRDNVMA$ ;  
 CDR2, содержащей последовательность  $AIINX_{38}GGSX_{39}NVD$ ; и  
 CDR3, содержащей последовательность  $CNVYYRX_{40}LW$ ;  
 CDR1, содержащей последовательность  $SIFSIARMN$  или  $FTLDYYAIA$ ;  
 CDR2, содержащей последовательность  $AILNRAGRDTYA$ ; и  
 CDR3, содержащей последовательность  $CNLQTISYHDFW$ ; и  
 CDR1, содержащей последовательность  $SIFSATRME$ ;  
 CDR2, содержащей последовательность  $AIVTSGGRTNYA$ ; и  
 CDR3, содержащей последовательность  $CKFERYDYVNYW$ ;  
 где  $X_1$ - $X_{39}$  представляют собой любую природную аминокислоту.

105. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 104, отличающаяся тем, что:

$X_4$  представляет собой неполярную аминокислоту;  
 $X_5$  представляет собой полярную аминокислоту;  
 $X_6$  представляет собой неполярную аминокислоту;  
 $X_{11}$  представляет собой полярную аминокислоту;  
 $X_{12}$  представляет собой неполярную аминокислоту;  
 $X_{16}$  представляет собой полярную аминокислоту;  
 $X_{18}$  представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту;  
 $X_{21}$  представляет собой неполярную аминокислоту;  
 $X_{24}$  представляет собой неполярную аминокислоту;  
 $X_{25}$  представляет собой полярную аминокислоту;  
 $X_{29}$  представляет собой неполярную аминокислоту; и/или  
 $X_{39}$  представляет собой неполярную аминокислоту.

106. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 104 или 105, отличающаяся тем, что:

CDR1 содержит последовательность  $X_1X_2FX_3IX_4RGX_5$ ,  
 где  $X_1$  представляет собой S или G;  $X_2$  представляет собой I или T;  $X_3$  представляет собой D или G;  $X_4$  представляет собой V или A; и  $X_5$  представляет собой S или N;  
 CDR2 содержит последовательность  $AIX_6TSGX_7ATX_8YA$ ,  
 где  $X_8$  представляет собой I или V;  $X_9$  представляет собой G или D; и  $X_{10}$  представляет собой N или D; и  
 CDR3 содержит последовательность  $CNMEX_{11}X_{12}X_{13}YRX_{14}YW$ ,  
 где  $X_{11}$  представляет собой S или T;  $X_{12}$  представляет собой F, V, или L;  $X_{13}$  представляет собой R или S; и  $X_{14}$  представляет собой N или H;

CDR1 содержит последовательность  $X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}YX_{20}X_{21}X_{22}$ ,

где  $X_{15}$  представляет собой F, L, или R;  $X_{16}$  представляет собой T, S, или N;  $X_{17}$  представляет собой L, F, или R;  $X_{18}$  представляет собой D или E;  $X_{19}$  представляет собой R, H, Y, K, N;  $X_{20}$  представляет собой S, A, или T;  $X_{21}$  представляет собой I, V, или M; и  $X_{22}$  представляет собой G или N;

CDR2 содержит последовательность  $X_{23}CX_{24}X_{25}SX_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}KYA$ ,

где  $X_{23}$  представляет собой S, A, T, или L;  $X_{24}$  представляет собой I или V;  $X_{25}$  представляет собой S или T;  $X_{26}$  представляет собой S, K, или N;  $X_{27}$  представляет собой G или S;  $X_{28}$  представляет собой G или D;  $X_{29}$  представляет собой I, L, или V; и  $X_{30}$  представляет собой P, T, I, или V; и

CDR3 содержит последовательность  $CX_{31}AAX_{32}PX_{33}DDCSVX_{34}GX_{35}YGLNYW$ ,

где  $X_{31}$  представляет собой G, T, или A;  $X_{32}$  представляет собой T, G, или D;  $X_{33}$  представляет собой D, P, A, или K;  $X_{34}$  представляет собой P, A, или H; и  $X_{35}$  представляет собой H или Y;

CDR1 содержит последовательность  $X_{36}TFDAYAIG$ ,

где  $X_{36}$  представляет собой F или H;

CDR2, содержащую последовательность ICLSPSDGSTYYA; и

CDR3, содержащую последовательность  $CAX_{37}PSWCSLKADFGSW$ ,

где  $X_{37}$  представляет собой T или A; или

CDR1 представляет собой SIIRDNVMA;

CDR2 содержит последовательность  $AIIIX_{38}GGX_{39}NVD$ ,

где  $X_{38}$  представляет собой T или I; и  $X_{39}$  представляет собой A или G; и

CDR3 содержит последовательность  $CNVYYRX_{40}LW$ ,

где  $X_{40}$  представляет собой D или G.

107. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 94-106, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела содержат переменный домен, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 603-620 или 622-688.

108. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 107, отличающаяся тем, что переменный домен имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 603-620 или 622-688.

109. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 108, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 603-620 или 622-688.

110. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 605.

111. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 611.

112. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 613.

113. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 620.

114. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 618.

115. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 603.

116. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 615.

117. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 608.

118. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 109, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 610.

119. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 104-118, отличающаяся тем, что

(i) CDR1 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 87-104 или 107-172;

(ii) CDR2 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 259-276 или 279-344; и

(iii) CDR3 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 431-448 или 451-516.

120. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 104-119, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 89, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 261 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 433.

121. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 104-119, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 95, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 267 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 439.

122. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 104-119, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 97, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 269 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 441.

123. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 104-119, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 104, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 276 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO:

448.

124. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 104-119, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 102, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 274 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 446.

125. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 104-119, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 87, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 259 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 431.

126. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 104-119, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 99, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 271 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 443.

127. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 104-119, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 92, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 264 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 436.

128. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 104-119, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 94, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 266 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 439.

129. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 94-97, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

130. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 129, отличающаяся тем, что scFv содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835.

131. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 129, отличающаяся тем, что scFv содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835.

132. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 129, отличающаяся тем, что scFv содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 783-835.

133. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 129-132, отличающаяся тем, что scFv содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047.

134. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 129-132, отличающаяся тем, что scFv содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047.

135. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов

осуществления 129-132, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен легкой цепи (VL), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 995-1047.

136. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 130-135, отличающаяся тем, что домен VH содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDRH1), имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 836-888, CDRH2, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 889-941, и CDRH3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 942-994.

137. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 130-136, отличающаяся тем, что домен VL содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDRL1), имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1048-1100, CDRL2, имеющую последовательность любую из SEQ ID NO: 1101-1153, и CDRL3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1154-1206.

138. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 129-137, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800.

139. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 129-137, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800.

140. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 129-137, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 800.

141. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 138-140, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012.

142. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 138-140, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012.

143. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 138-140, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1012.

144. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 138-143, отличающаяся тем, что домен VH содержит CDRH1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 853, CDRH2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 906, и CDRH3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 959.

145. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 138-144, отличающаяся тем, что домен VL содержит CDRL1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1065, CDRL2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1118, и CDRL3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1171.

146. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 129-137, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по

меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 783.

147. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 129-137, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 783.

148. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 129-137, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 783.

149. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 146-148, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 995.

150. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 146-148, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 995.

151. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 146-148, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий последовательность SEQ ID NO: 995.

152. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 146-151, отличающаяся тем, что домен VH содержит CDRH1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 836, CDRH2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 889, и CDRH3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 942.

153. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 146-152, отличающаяся тем, что домен VL содержит CDRL1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1048, CDRL2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1101, и CDRL3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1154.

154. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 129-137, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 784.

155. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 129-137, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 784.

156. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 129-137, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 784.

157. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 154-156, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 996.

158. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 154-156, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 996.

159. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов

осуществления 154-156, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий последовательность SEQ ID NO: 996.

160. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 154-159, отличающаяся тем, что домен VH содержит CDRH1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 837, CDRH2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 890, и CDRH3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 943.

161. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 154-160, отличающаяся тем, что домен VL содержит CDRL1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1049, CDRL2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1102, и CDRL3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1155.

162. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 129-161, отличающаяся тем, что scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 782.

163. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 94-162, отличающаяся тем, что молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую константный домен TCR.

164. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 163, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела функционально связаны с последовательностью, кодирующей константный домен TCR, тем самым образуя TFP.

165. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 163 или 164, отличающаяся тем, что константный домен TCR представляет собой константный домен TCR-альфа или его часть, константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-альфа или его часть и константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-гамма или его часть, константный домен TCR-дельта или его часть или константный домен TCR-гамма или его часть и константный домен TCR-дельта или его часть.

166. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 94-165, дополнительно содержащая лидерную последовательность.

167. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-166, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из ДНК и РНК.

168. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 167, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

169. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 167, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой кРНК.

170. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-169, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота содержит нуклеотидный аналог.

171. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления

170, отличающаяся тем, что нуклеотидный аналог выбран из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропила, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор, 2'-О-аминопропила (2'-О-АР), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-ДМАОЕ), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-ДМАР), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-ДМАЕОЕ), модифицированного 2'-О-N-метилацетида (2'-О-NМА), закрытой нуклеиновой кислоты (ЗНК), этиленнуклеиновой кислоты (ЭНК), пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК), 1',5'-ангидрогекситоловой нуклеиновой кислоты (АНК), морфолино, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор N3-P5'-фосфорамидита.

172. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-171, дополнительно содержащая промотор.

173. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-172, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой транскрибируемую *in vitro* нуклеиновую кислоту.

174. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-173, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую поли(А)-хвост.

175. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-174, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность 3'UTR.

176. Полипептид, кодируемый молекулой рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-175.

177. Вектор, содержащий молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP по любому из вариантов осуществления 1-93, 164, или 165.

178. Вектор, содержащий молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент по вариантам осуществления 94-163.

179. Вектор по варианту осуществления 177, дополнительно содержащий последовательность, кодирующую кРНК, кшРНК или миРНК для снижения эндогенных уровней CD70.

180. Вектор по варианту осуществления 177, дополнительно содержащий последовательность, кодирующую ингибирующую молекулу, содержащую первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанную со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.

181. Вектор по варианту осуществления 177, дополнительно содержащий последовательность, кодирующую константный домен TCR.

182. Вектор по варианту осуществления 181, отличающийся тем, что константный домен TCR представляет собой константный домен TCR-альфа или его часть, константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-альфа или его часть и константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-гамма или его

часть, константный домен TCR-дельта или его часть или константный домен TCR-гамма или его часть и константный домен TCR-дельта или его часть.

183. Вектор по любому из вариантов осуществления 177-182, отличающийся тем, что вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, вектора на основе вируса саркомы Рауса (RSV) или ретровирусного вектора.

184. Вектор по любому из вариантов осуществления 177-183, дополнительно содержащий промотор.

185. Вектор по любому из вариантов осуществления 177-184, отличающийся тем, что вектор представляет собой вектор, транскрибируемый *in vitro*.

186. Вектор по любому из вариантов осуществления 177-185, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит поли(A)-хвост.

187. Вектор по любому из вариантов осуществления 177-186, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3'UTR.

188. Клетка, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-175, полипептид по варианту осуществления 176 или вектор по любому из вариантов осуществления 177-187.

189. Клетка по варианту осуществления 188, отличающаяся тем, что клетка представляет собой Т-клетку.

190. Т-клетка по варианту осуществления 189, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой Т-клетку человека.

191. Т-клетка по варианту осуществления 189 или 190, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Т-клетку.

192. Т-клетка по варианту осуществления 189, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой  $\alpha\beta$ -Т-клетку человека.

193. Т-клетка по варианту осуществления 189, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой  $\gamma\delta$ -Т-клетку человека.

194. Клетка по варианту осуществления 188, отличающаяся тем, что клетка представляет собой НКТ-клетку человека.

195. Клетка по любому из вариантов осуществления 188-194, отличающаяся тем, что клетка имеет функциональное нарушение эндогенного TCR.

196. Клетка по любому из вариантов осуществления 188-195, отличающаяся тем, что клетка представляет собой аллогенную клетку.

197. Клетка по любому из вариантов осуществления 188-196, отличающаяся тем, что клетка имеет функциональное нарушение эндогенного гена CD70.

198. Клетка по любому из вариантов осуществления 188-196, отличающаяся тем, что клетка имеет функциональное нарушение эндогенного гена СИТА.

199. Клетка по любому из вариантов осуществления 188-196, отличающаяся тем, что клетка дополнительно содержит антисмысловую кРНК, кшРНК или миРНК для

снижения эндогенных уровней CD70.

200. Клетка по любому из вариантов осуществления 188-196, отличающаяся тем, что клетка дополнительно содержит антисмысловую кРНК, кшРНК или миРНК для снижения эндогенных уровней СРТА.

201. Клетка по любому из вариантов осуществления 188-196, отличающаяся тем, что клетка дополнительно содержит последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен.

202. Клетка по варианту осуществления 201, отличающаяся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую слитый белок.

203. Клетка по варианту осуществления 202, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая TFP, и последовательность, кодирующая слитый белок, содержатся в одном и том же опероне.

204. Клетка по любому из вариантов осуществления 201-203, отличающаяся тем, что удерживающий в ЭПР домен кодируется любой из SEQ ID NO: 756-779.

205. Клетка по любому из вариантов осуществления 201-204, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая слитый белок, дополнительно содержит трансмембранный домен CD8-альфа между доменом антитела к CD70 и удерживающим в ЭПР доменом.

206. Клетка по любому из вариантов осуществления 201-205, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая слитый белок, дополнительно содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид CD8-альфа, которая находится на 5'-конце от последовательности, кодирующей домен антитела к CD70.

207. Клетка по любому из вариантов осуществления 201-206, отличающаяся тем, что домен антитела включает антитело к CD70 по любому из вариантов осуществления 94-128.

208. Клетка по любому из вариантов осуществления 188-196, отличающаяся тем, что клетка содержит экспрессированный на клеточной поверхности CD70, связанный с антителом к CD70.

209. Клетка по варианту осуществления 208, отличающаяся тем, что антитело к CD70 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой по вариантам осуществления 94-128.

210. Клетка по варианту осуществления 208, отличающаяся тем, что антитело к CD70 имеет большую аффинность к CD70, чем антитело или антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой по вариантам осуществления 94-163.

211. Клетка по любому из вариантов осуществления 188-210, отличающаяся тем, что клетка дополнительно содержит гетерологичную последовательность, кодирующую ингибирующую молекулу, содержащую первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанную со вторым полипептидом, который

содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.

212. Клетка по любому из вариантов осуществления 188-211, отличающаяся тем, что клетка дополнительно содержит гетерологичную последовательность, кодирующую константный домен TCR.

213. Клетка по варианту осуществления 212, отличающаяся тем, что константный домен TCR представляет собой константный домен TCR-альфа или его часть, константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-альфа или его часть и константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-гамма или его часть, константный домен TCR-дельта или его часть или константный домен TCR-гамма или его часть и константный домен TCR-дельта или его часть.

214. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по любому из вариантов осуществления 188-213 и фармацевтически приемлемый носитель.

215. Способ получения клетки по варианту осуществления 197, включающий:  
нарушение эндогенного гена CD70 с получением таким образом клетки, имеющей функциональное нарушение эндогенного гена CD70; и

трансдукции клетки, имеющей функциональное нарушение эндогенного гена CD70, рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из вариантов осуществления 1-93, 164, или 165, или вектором по любому из вариантов осуществления 177 или 180-187.

216. Способ по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что нарушение включает трансдукцию клетки белком нуклеазой или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей нуклеазный белок, нацеленный на эндогенный ген CD70.

217. Способ по варианту осуществления 215 или 216, отличающийся тем, что способ дополнительно включает нарушение эндогенного TCR.

218. Способ получения клетки по варианту осуществления 197, включающий трансдукцию клетки, имеющую нарушение эндогенного гена CD70, рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из вариантов осуществления 1-93, 164 или 165, или вектором по любому из вариантов осуществления 177 или 180-187.

219. Способ по варианту осуществления 218, отличающийся тем, что клетка дополнительно включает нарушение эндогенного TCR.

220. Способ получения клетки по любому из вариантов осуществления 188-196 или 208-210, включающий:

трансдукцию клетки рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из вариантов осуществления 1-93, 164, или 165, или вектором по любому из вариантов осуществления 177 или 180-187; и

приведение в контакт клетки с антителом к CD70, которое связывается с CD70 на поверхности клетки.

221. Способ по варианту осуществления 220, отличающийся тем, что антитело к CD70 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой по вариантам осуществления 94-163.

222. Способ по варианту осуществления 220, отличающийся тем, что антитело к

CD70 имеет большую аффинность к CD70, чем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой по вариантам осуществления 94-163.

223. Способ по любому из вариантов осуществления 220-222, отличающийся тем, что приведение в контакт проводят до трансдукции.

224. Способ по варианту осуществления 223, отличающийся тем, что приведение в контакт проводят за 1 день до трансдукции.

225. Способ по любому из вариантов осуществления 220-222, отличающийся тем, что приведение в контакт проводят после трансдукции.

226. Способ по варианту осуществления 225, отличающийся тем, что приведение в контакт проводят в течение 5 дней после трансдукции.

227. Способ по любому из вариантов осуществления 220-226, дополнительно включающий субкультивирование клеток в среде, не содержащей антитело к CD70, через 4 или более дней после трансдукции.

228. Способ по варианту осуществления 227, отличающийся тем, что субкультивирование включает субкультивирование клеток в среде, не содержащей антитело к CD70, через 7 или более дней после трансдукции.

229. Способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по варианту осуществления 214.

230. Способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей (а) клетку по любому из вариантов осуществления 188-213; и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

231. Способ по варианту осуществления 229 или 230, отличающийся тем, что злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование, ассоциированное с повышенной экспрессией CD70.

232. Способ по любому из вариантов осуществления 229-231, дополнительно включающий введение субъекту агента, который повышает уровни CD70 в раковых клетках.

233. Способ по варианту осуществления 232, отличающийся тем, что агент, который повышает уровень CD70, представляет собой гипометилирующий агент.

234. Способ по варианту осуществления 233, отличающийся тем, что гипометилирующий агент представляет собой 5-азациитидин или децитабин.

235. Способ по любому из вариантов осуществления 229-234, отличающийся тем, что заболевание или патологическое состояние выбрано из группы, состоящей из Т-клеточной лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), мантийно-клеточной лимфомы (MCL), острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластического синдрома (MDS), вируса Эпштейна-Барра (EBV) + злокачественного новообразования и/или вируса папилломы человека (HPV) +

злокачественного новообразования.

236. Способ по любому из вариантов осуществления 229-234, отличающийся тем, что заболевание или патологическое состояние выбрано из группы, состоящей из рака почки, почечно-клеточного рака, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, рака носоглотки, мезотелиомы, глиобластомы, рака тимуса, рака молочной железы, рака головы и рака шеи и рака желудка.

237. Способ по любому из вариантов осуществления 229-236, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека.

238. Способ получения клетки по варианту осуществления 198, включающий:  
нарушение эндогенного гена СПТА с получением таким образом клетки, имеющей функциональное нарушение эндогенного гена СПТА 0; и

трансдукцию клетки, содержащей функциональное нарушение эндогенного гена СПТА, рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из вариантов осуществления 1-93, 164, или 165, или вектором по любому из вариантов осуществления 177 или 180-187.

239. Способ по варианту осуществления 238, отличающийся тем, что нарушение включает трансдукцию клетки белком нуклеазой или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей нуклеазный белок, нацеленный на эндогенный ген СПТА.

240. Способ по варианту осуществления 238 или 239, отличающийся тем, что способ дополнительно включает нарушение эндогенного TCR.

241. Способ получения клетки по варианту осуществления 198, включающий трансдукцию клетки, имеющую нарушение эндогенного гена СПТА рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из вариантов осуществления 1-93, 164 или 165, или вектором по любому из вариантов осуществления 177 или 180-187.

242. Способ по варианту осуществления 218, отличающийся тем, что клетка дополнительно включает нарушение эндогенного TCR.

243. Способ получения клетки по любому из вариантов осуществления 201-207, включающий трансдукцию клетки рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из вариантов осуществления 1-93, 164, или 165 или вектором по любому из вариантов осуществления 177 или 180-187, последовательностью, кодирующей слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен.

244. Способ по варианту осуществления 243, отличающийся тем, что рекомбинантную нуклеиновую кислоту или вектор и последовательность, кодирующую слитый белок, трансдуцируют одновременно.

245. Способ по варианту осуществления 244, отличающийся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота или вектор содержат последовательность, кодирующую слитый белок.

246. Способ по варианту осуществления 245, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая TFR, и последовательность, кодирующая слитый белок, содержатся в одном и том же опероне.

247. Способ по варианту осуществления 243, отличающийся тем, что

рекомбинантную нуклеиновую кислоту или вектор трансдуцируют до или после последовательности, кодирующей слитый белок.

248. Способ по любому из вариантов осуществления 243-247, отличающийся тем, что удерживающий в ЭПР домен кодируется любой из SEQ ID NO: 756-779.

249. Способ по любому из вариантов осуществления 243-248, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая слитый белок, дополнительно содержит трансмембранный домен CD8-альфа между доменом антитела к CD70 и удерживающим в ЭПР доменом.

250. Способ по любому из вариантов осуществления 243-249, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая слитый белок, дополнительно содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид CD8-альфа, которая находится на 5'-конце от последовательности, кодирующей домен антитела к CD70.

251. Способ по любому из вариантов осуществления 243-250, отличающийся тем, что домен антитела включает антитело к CD70 по любому из вариантов осуществления 94-128.

Таблица 5. Таблица иллюстративных последовательностей

TCR	Клон тип	Компонент	SEQ ID NO:	Последовательность
R3P2 G8	1	FW1	1	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	87	SIFDIARGN
		FW2	173	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	259	AIITSGGATNYA
		FW3	345	DSVAGRFTISRDDAKNTVYLMNGLKPEDTAVYF
		CDR3	431	CNMESLSYRHYW
		FW4	517	GQGTQVTVSS
		AK VH	603	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIARGN WYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDDAKNTVYLMNGLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
R3P3 G1	1	FW1	2	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	88	SIFDIARGN
		FW2	174	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	260	AIITSGGATNYA
		FW3	346	DSVAGRFTISRDTAWKALYLMNSLKPEDTAVYF

		CDR3	432	CNMESLSYRHYW
		FW4	518	GQGTQVTVSS
		AK VH	604	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
R3P3 H12	1	FW1	3	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	89	SIFDIVRGS
		FW2	175	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	261	AIITSGGATNYA
		FW3	347	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	433	CNMESVRYRNYW
		FW4	519	GQGTQVTVSS
		AK VH	605	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIV RGSWYRQAPGNQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS
-	1	FW1	4	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	90	STFDIARGN
		FW2	176	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	262	AIITSGGATNYA
		FW3	348	DSVAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	434	CNMESLSYRHYW
		FW4	520	GQGTQVTVSS
		AK VH	606	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSTFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
R3aP 7F10	1	FW1	5	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	91	SIFDIARGN
		FW2	177	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	263	AIITSGGATNYA

		FW3	349	DSVAGRFTISRDSA WKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	435	CNMFETFSYRNYW
		FW4	521	GQGTQVTVSS
		AK VH	607	QVQLQESGGGLVQ TGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDSA WKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMFETFSYRNYWGQGTQVTVSS
R2P1 4A12	2	FW1	6	QVQLQESGGGLVQP GGSRLRLSCVASG
		CDR1	92	FTLDRYAVG
		FW2	178	WFRQAPGKELEGV
		CDR2	264	SCISSSGDIIKYA
		FW3	350	DSAKGRFTIARDNAKNTAYLQMNSLKPEDTA VYY
		CDR3	436	CTAADPKDDCSVPGYYGLNYW
		FW4	522	GKGTQVTVSS
		AK VH	608	QVQLQESGGGLVQP GGSRLRLSCVASGFTLDR YAVGWFRQAPGKELEGVSCISSSGDIIKYADS AKGRFTIARDNAKNTAYLQMNSLKPEDTAVY YCTAADPKDDCSVPGYYGLNYWGKGTQVTV SS
R2P1 6E7	2	FW1	7	QVQLQESGGGLVQP GGSRLRLSCVASG
		CDR1	93	FTLDRYSVN
		FW2	179	WFRQAPGKEREV
		CDR2	265	TCITSSGDIIKYA
		FW3	351	DSAKGRFTISRDN AKNTAYLEMNSLKPEDTA VYY
		CDR3	437	CAAAGPKDDCSVPGYYGLNYW
		FW4	523	GKGTQVTVSS
		AK VH	609	QVQLQESGGGLVQP GGSRLRLSCVASGFTLDR YSVNWFRQAPGKEREVTCITSSGDIIKYADS AKGRFTISRDN AKNTAYLEMNSLKPEDTAVY YCAAAGPKDDCSVPGYYGLNYWGKGTQVTV SS

R3P1 5F6	2	FW1	8	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASG
		CDR1	94	FTLDKYAIG
		FW2	180	WFRQAPGKELEGV
		CDR2	266	SCITSSSGVVKYA
		FW3	352	DSVKGRFIISRDNTNNRAFLQMSSLKPEDTAV YY
		CDR3	438	CAAAGPPDDCSVPGYYGLNYW
		FW4	524	GKGTQVTVSS
		AK VH	610	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTLDK YAIGWFRQAPGKELEGVSCITSSSGVVKYADS VKGRFIISRDNTNNRAFLQMSSLKPEDTAVYY CAAAGPPDDCSVPGYYGLNYWGKGTQVTVS S
R2P1 6D9	2	FW1	9	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
		CDR1	95	FTLEHYSIG
		FW2	181	WFRQAPGKDLEGV
		CDR2	267	SCITSSGGIPKYA
		FW3	353	DSVKGRFIISRDNAKNTGYLQMNSLKPEDTA VYY
		CDR3	439	CGAATPDDDCSVPGHYGLNYW
		FW4	525	GKGTQVTVSS
		AK VH	611	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEH YSIGWFRQAPGKDLEGVSCITSSGGIPKYADS VKGRFIISRDNAKNTGYLQMNSLKPEDTAVY YCGAATPDDDCSVPGHYGLNYWGKGTQVTV SS
-	2	FW1	10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASD
		CDR1	96	FNLERYAIN
		FW2	182	WFRQAPGKEREV
		CDR2	268	LCITSSGGITKYA
		FW3	354	NSVKGRFIISRDNTKNRAYLQMNSLKPEDTAV YY
		CDR3	440	CAAAGPPDDCSVPGYYGLNYW
		FW4	526	GKGTQVTVSS

		AK VH	612	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASDFNLER YAINWFRQAPGKEREGLVLCITSSGGITKYANS VKGRFIISRDNTKNRAYLQMNSLKPEDTAVY YCAAAGPPDDCSVPGYYGLNYWGKGTQVTV SS
R3aP 9D10	3	FW1	11	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAPG
		CDR1	97	FTFDAYAIG
		FW2	183	WFRQAPGKEREGLV
		CDR2	269	ICLSPSDGSTYYA
		FW3	355	DSVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPEDTA VYY
		CDR3	441	CATPSWCSLKADFGSW
		FW4	527	GQGTQVTVSS
		AK VH	613	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAPGFTFDA YAIGWFRQAPGKEREGLVLCI LSPSDGSTYYADS VKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVY YCATPSWCSLKADFGSWGQGTQVTVSS
-	3	FW1	12	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAASG
		CDR1	98	HTFDAYAIG
		FW2	184	WFRQAPGKEREGLV
		CDR2	270	ICLSPSDGSTYYA
		FW3	356	DSVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPEDTA VYY
		CDR3	442	CAAPSWCSLKADFGSW
		FW4	528	GQGTQVTVSS
		AK VH	614	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAASGHTFDA YAIGWFRQAPGKEREGLVLCI LSPSDGSTYYADS VKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVY YCAAPSWCSLKADFGSWGQGTQVTVSS
R3aP 4D6	4	FW1	13	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASK
		CDR1	99	SIIRDNVMA
		FW2	185	WHRQAPGKQRELV
		CDR2	271	AIINTGGSANVD
		FW3	357	DSVKGRFTISRDNAMVYLMNMLKPEDT

				AVYY
		CDR3	443	CNVYYRDLW
		FW4	529	GQGTQVTVSS
		AK VH	615	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASKSIIRDN VMAWHRQAPGKQRELVAIINTGGSANVDDS VKGRFTISRDNAMVYLMNLLKPEDTAV YYCNVYYRDLWGQGTQVTVSS
-	4	FW1	14	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASK
		CDR1	100	SIIRDNVMA
		FW2	186	WHRQAPGKQRELV
		CDR2	272	AIINTGGSANVD
		FW3	358	DSVKGRFTISRDNAMVYLMNLLKPEDT AVYY
		CDR3	444	CNVYYRDLW
		FW4	530	GQGTQVTVSS
		AK VH	616	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASKSIIRDN VMAWHRQAPGKQRELVAIINTGGSANVDDS VKGRFTISRDNAMVYLMNLLKPEDTAV YYCNVYYRDLWGQGTQVTVSS
-	4	FW1	15	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASK
		CDR1	101	SIIRDNVMA
		FW2	187	WHRQAPGKQRELV
		CDR2	273	AIINTGGSANVD
		FW3	359	DSVKGRFTISRDNAMVYLMNLLKPEDT AVYY
		CDR3	445	CNVYYRGLW
		FW4	531	GQGTQVTVSS
		AK VH	617	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASKSIIRDN VMAWHRQAPGKQRELVAIINTGGSANVDDS VKGRFTISRDNAMVYLMNLLKPEDTAV YYCNVYYRGLWGQGTQVTVSS
R3aP 3E8	5	FW1	16	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASG
		CDR1	102	SIFSIARMN
		FW2	188	WYRQAPGKQRELV

		CDR2	274	AILNRAGRTDYA
		FW3	360	DSVKGRFTISSDNAKTTVYLQMNSLKPEDTAL YY
		CDR3	446	CNLQTISYHDFW
		FW4	532	GQGTQVTVSS
		AK VH	618	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIFSIA RMNWYRQAPGKQRELVAILNRAGRTDYADS VKGRFTISSDNAKTTVYLQMNSLKPEDTALY YCNLQTISYHDFWGQGTQVTVSS
-	5	FW1	17	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
		CDR1	103	FTLDYYAIA
		FW2	189	WFRQAPGKQRELV
		CDR2	275	AILNRAGRTDYA
		FW3	361	DSVKGRFTISSDNAKTTVYLQMNSLKPEDTAL YY
		CDR3	447	CNLQTISYHDFW
		FW4	533	GQGTQVTVSS
		AK VH	619	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDY YAIAWFRQAPGKQRELVAILNRAGRTDYADS VKGRFTISSDNAKTTVYLQMNSLKPEDTALY YCNLQTISYHDFWGQGTQVTVSS
R3P5 A1	6	FW1	18	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	104	SIFSATRME
		FW2	190	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	276	AIVTSGGRTNYA
		FW3	362	DSVNGRFTISRDNKNTLYLQMNNLKPEDTA VYY
		CDR3	448	CKFERDYVNYW
		FW4	534	GRGTQVTVSS
		AK VH	620	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFSAT RMEWYRQAPGKQRELV AIVTSGGRTNYADS VNGRFTISRDNKNTLYLQMNNLKPEDTAVY YCKFERDYVNYWGRGTQVTVSS
1F6	Контр	FW1	19	QIQLVQSGPEVKKPGETVKISCKASG

	оль 1	CDR1	105	YTFTNYGMN
		FW2	191	WVKQAPGKGLKWM
		CDR2	277	GWINTYTGEPTYA
		FW3	363	DAFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNETAT YF
		CDR3	449	CARDYGDYGMDYW
		FW4	535	GQGTSVTVSS
		AK VH	621	QIQLVQSGPEVKKPGETVKISCKASGYTFTNY GMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYA DAFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNETAT YFCARDYGDYGMDYWGQGTSVTVSS
41D1 2	Контр оль 2	FW1	20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
		CDR1	106	FTFSVYYMN
		FW2	192	WVRQAPGKGLEWV
		CDR2	278	SDINNEGTTYYA
		FW3	364	DSVKGRFTISRDN SKNSLYLQMNSLRAEDTA VYY
		CDR3	450	CARDAGYSNHVPIFDSW
		FW4	536	GQGTLVTVSS
		AK VH	622	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVY YMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYAD SVKGRFTISRDN SKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDAGYSNHVPIFDSWGQGTLVTVSS
3HC DS10 9	1	FW1	21	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	107	SIFDIARGN
		FW2	193	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	279	AIITSGGATNYA
		FW3	365	DSVAGRFTISRDSA WKALYLQMNSLKPGDTA VYF
		CDR3	451	CNMETFSYRNYW
		FW4	537	GQGTQVTVSS
		AK VH	623	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDSA WKALYLQMNSLKPGDTAVYF

				CNMFETFSYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3aP 10H6	1	FW1	22	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	108	SIFDIARGN
		FW2	194	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	280	AIITSGDATNYA
		FW3	366	DSVAGRFTISRDSA WKALY LQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	452	CNMFETFSYRNYW
		FW4	538	GQGTQVTVSS
		AK VH	624	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIITSGDATNYADSV AGRFTISRDSA WKALY LQMNSLKPEDTAVYF CNMFETFSYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3aP 6E5	1	FW1	23	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	109	SIFDIARGN
		FW2	195	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	281	AIITSGDATNYA
		FW3	367	DSVAGRFTISRDSA WKALY LQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	453	CNMFETFSYRNYW
		FW4	539	GQGTQVTVSS
		AK VH	625	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIITSGDATNYADSV AGRFTISRDSA WKALY LQMNSLKPEDTAVYF CNMFETFSYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R2P1 2A4	1	FW1	24	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	110	SIFDIARGN
		FW2	196	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	282	AIITSGDATNYA
		FW3	368	DSVAGRFTISRDSA WKALY LQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	454	CNMFETFSYRNYW
		FW4	540	GQGTQVTVSS
		AK VH	626	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFDIA

				RGNWYRQAPGKQRELVAITSGDATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMETFSYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3aP 8G1	1	FW1	25	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	111	SIFDIARGN
		FW2	197	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	283	AIITSGGATDYA
		FW3	369	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	455	CNMETFSYRNYW
		FW4	541	GQGTQVTVSS
		AK VH	627	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAITSGGATDYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMETFSYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3P8 F1	1	FW1	26	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	112	SIFDIARGN
		FW2	198	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	284	AIITSGGATNYA
		FW3	370	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	456	CNMETFSYRNYW
		FW4	542	GQGTQVTVSS
		AK VH	628	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMETFSYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R2P3 G2	1	FW1	27	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	113	SIFDIARGN
		FW2	199	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	285	AIITSGGATNYA
		FW3	371	DPVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	457	CNMETFSYRNYW

		FW4	543	GQGTQVTVSS
		AK VH	629	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADPV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMETFSYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R2P2 0G2	1	FW1	28	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	114	SIFDIARGN
		FW2	200	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	286	AIITSGGATNYA
		FW3	372	DSVAGRFAISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	458	CNMETFSYRNYW
		FW4	544	GQGTQVTVSS
		AK VH	630	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFAISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMETFSYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3P1 1G12	1	FW1	29	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	115	SIFDIARGN
		FW2	201	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	287	AIITSGGATNYA
		FW3	373	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	459	CNMETFSYRNYW
		FW4	545	GQGTQVTVSS
		AK VH	631	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMETFSYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3aP 7F9	1	FW1	30	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	116	SIFDIARGN
		FW2	202	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	288	AIITSGGATNYA
		FW3	374	DSVAGRFTISRDSARKALYLQMNSLKPEDTA

				VYF
		CDR3	460	CNMETFSYRNYW
		FW4	546	GQGTQVTVSS
		AK VH	632	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDSARKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMETFSYRNYWGQGTQVTVSS
3HC DS15 1	1	FW1	31	QVQLQESGGGLVHAGGSLRLSCAVSG
		CDR1	117	SIFDIVRGS
		FW2	203	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	289	AIITSGGATNYA
		FW3	375	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	461	CNMESVRYRNYW
		FW4	547	GQGTQVTVSS
		AK VH	633	QVQLQESGGGLVHAGGSLRLSCAVSGSIFDIV RGSWYRQAPGNQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS
3HC DS16 8	1	FW1	32	QVQLQESGGGLVQSEGLRLSACAASG
		CDR1	118	SIFDIVRGS
		FW2	204	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	290	AIITSGGATNYA
		FW3	376	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	462	CNMESVRYRNYW
		FW4	548	GQGTQVTVSS
		AK VH	634	QVQLQESGGGLVQSEGLRLSACAASGSIFDIV RGSWYRQAPGNQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3aP 1A1	1	FW1	33	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	119	SIFDIVRGS
		FW2	205	WYRQAPGNQRELV

		CDR2	291	AIITSGGATNYA
		FW3	377	DSVAGRLTISRDSA WKALYLQMNSLKP EDTAVYF
		CDR3	463	CNMESVRYRNYW
		FW4	549	GQGTQVTVSS
		AK VH	635	QVQLQESGGGLVQ TGGSLRLSCTASG SIFDIV RGSWYRQAPGNQ RELVAITSGGATN YADSV AGRLTISRDSA WKALYLQMNSLKP EDTAVYF CNMESVRYRNYW GQGTQVTVSS
SID1 R3aP 2F5	1	FW1	34	QVQLQESGGGLVQ TGGSLRLSCTASG
		CDR1	120	SIFDIVRGS
		FW2	206	WYRQAPGNQREL V
		CDR2	292	AIITSGGATNYA
		FW3	378	DSVAGRFTISR DGAWKALYLQMNS LKPEDTAVYF
		CDR3	464	CNMESVRYRNYW
		FW4	550	GQGTQVTVSS
		AK VH	636	QVQLQESGGGLVQ TGGSLRLSCTASG SIFDIV RGSWYRQAPGNQ RELVAITSGGATN YADSV AGRFTISR DGAWKALYLQMNS LKPEDTAVYF CNMESVRYRNYW GQGTQVTVSS
SID1 R3P1 C5	1	FW1	35	QVQLQESGGGLVQ TGGSLRLSCTASG
		CDR1	121	SIFDIVRGS
		FW2	207	WYRQVPGNQREL V
		CDR2	293	AIITSGGATNYA
		FW3	379	DSVAGRFTISR DSA WKALYLQMNSLKP EDTAVYF
		CDR3	465	CNMESVRYRNYW
		FW4	551	GQGTQVTVSS
		AK VH	637	QVQLQESGGGLVQ TGGSLRLSCTASG SIFDIV RGSWYRQVPGN QRELVAITSGGAT NYADSV AGRFTISR DSA WKALYLQMNSLKP EDTAVYF CNMESVRYRNYW GQGTQVTVSS
2HC	1	FW1	36	QVQLQESGGGLVQ TGGSLRLSCTVSG

DS48		CDR1	122	SIFDIVRGS
		FW2	208	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	294	AIITSGGATNYA
		FW3	380	DSVAGRFTISRDSAWKALYLMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	466	CNMESVRYRNYW
		FW4	552	GQGTQVTVSS
		AK VH	638	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTVSGSIFDIV RGSWYRQAPGNQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLMNSLKPEDTAVYF CNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS
3HC DS12 6	1	FW1	37	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	123	SIFDIVRGS
		FW2	209	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	295	AIITSGGATNYA
		FW3	381	DSVAGRFTISRDSAWKALYLMNSLEPEDTA VYF
		CDR3	467	CNMESVRYRNYW
		FW4	553	GQGTQVTVSS
		AK VH	639	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIV RGSWYRQAPGNQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLMNSLEPEDTAVYF CNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3aP 5H5	1	FW1	38	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	124	SIFDIVRGN
		FW2	210	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	296	AIITSGGATNYA
		FW3	382	DSVAGRFTISRDSAWKALYLMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	468	CNMESVRYRNYW
		FW4	554	GQGTQVTVSS
		AK VH	640	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIV RGNWYRQAPGNQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLMNSLKPEDTAVYF

				CNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3P1 3G9	1	FW1	39	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	125	SIFDIVRGN
		FW2	211	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	297	AIITSGGATNYA
		FW3	383	DSVAGRFTISRDNARKALYLQMNSLKPEDTAVYF
		CDR3	469	CNMESVRYRNYW
		FW4	555	GQGTQVTVSS
		AK VH	641	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIV RGNWYRQAPGNQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDNARKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3P6 G3	1	FW1	40	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASG
		CDR1	126	SIFDIVRGN
		FW2	212	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	298	AIITSGGATNYA
		FW3	384	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF
		CDR3	470	CNMESVRYRNYW
		FW4	556	GQGTQVTVSS
		AK VH	642	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSIFDIV RGNWYRQAPGNQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3P2 C7	1	FW1	41	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	127	SIFDIVRGN
		FW2	213	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	299	AIITSGGATNYA
		FW3	385	DSVAGRFTISRDNARKALYLQMNSLKPEDTAVYF
		CDR3	471	CNMESVRYRNYW
		FW4	557	GQGTQVTVSS
		AK VH	643	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFDIV

				RGNWYRQAPGNQRELVAITSSGGATNYADSV AGRFTISRDNALKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESVRYSRNYWGQGTQVTVSS
3HC DS15	1	FW1	42	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	128	SIFDIVRGN
		FW2	214	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	300	AIITSSGGATNYA
		FW3	386	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	472	CNMESVRYSRNYW
		FW4	558	GQGTQVTVSS
		AK VH	644	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFDIV RGNWYRQAPGNQRELVAITSSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESVRYSRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3aP 5D4	1	FW1	43	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	129	SIFDIVRGN
		FW2	215	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	301	AIITSSGGATNYA
		FW3	387	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	473	CNMESVRYSRNYW
		FW4	559	GQGTQVTVSS
		AK VH	645	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFDIV RGNWYRQAPGNQRELVAITSSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESVRYSRNYWGQGTQVTVSS
3HC DS10 0	1	FW1	44	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	130	SIFGIVRGS
		FW2	216	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	302	AIITSSGGATNYA
		FW3	388	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	474	CNMESVRYSRNYW

		FW4	560	GQGTQVTVSS
		AK VH	646	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFGIV RGSWYRQAPGNQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS
3HC DS10 6	1	FW1	45	QVQLQESGGGLAQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	131	SIFDIVRGS
		FW2	217	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	303	AIITSGGATNYA
		FW3	389	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	475	CNMESVRYRNYW
		FW4	561	GQGTQVTVSS
		AK VH	647	QVQLQESGGGLAQPGGSLRLSCTASGSIFDIV RGSWYRQAPGNQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3aP 1E11	1	FW1	46	QVQLQESGGGLVQSGGSLRLSCTASG
		CDR1	132	SIFDIVRGS
		FW2	218	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	304	AIITSGGATNYA
		FW3	390	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	476	CNMESVRYRNYW
		FW4	562	GQGTQVTVSS
		AK VH	648	QVQLQESGGGLVQSGGSLRLSCTASGSIFDIV RGSWYRQAPGNQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS
3HC DS14 9	1	FW1	47	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	133	SIFDIVRGS
		FW2	219	WYRQAPGNQRELV
		CDR2	305	AIITSGGATNYA
		FW3	391	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA

				VYF
		CDR3	477	CNMESVRYRNYW
		FW4	563	GQGTQVTVSS
		AK VH	649	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFDIV RGSWYRQAPGNQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESVRYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R3aP 2F1	1	FW1	48	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	134	GIFDIARGN
		FW2	220	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	306	AIITSGGATNYA
		FW3	392	DSVAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	478	CNMESLSYRHYW
		FW4	564	GQGTQVTVSS
		AK VH	650	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGGIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
SID1 R3aP 2D7	1	FW1	49	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	135	SIFGIARGN
		FW2	221	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	307	AIITSGGATNYA
		FW3	393	DSVAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	479	CNMESLSYRHYW
		FW4	565	GQGTQVTVSS
		AK VH	651	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFGIA RGNWYRQAPGKQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
SID1 R3P1 A1	1	FW1	50	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	136	SIFDIARGN
		FW2	222	WYRQAPGKQRELV

		CDR2	308	AIVTSGGATNYA
		FW3	394	DSVAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	480	CNMESLSYRHYW
		FW4	566	GQGTQVTVSS
		AK VH	652	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIVTSGGATNYADS VAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTAVY FCNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
SID1 R3aP 3D12	1	FW1	51	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	137	SIFDIARGN
		FW2	223	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	309	AIITSGGATNYA
		FW3	395	DSVAGRFTISRGTAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	481	CNMESLSYRHYW
		FW4	567	GQGTQVTVSS
		AK VH	653	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRGTAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
SID1 R2P5 A5	1	FW1	52	QVQLQESGGGLVRTGGSLRLSCTASG
		CDR1	138	SIFDIARGN
		FW2	224	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	310	AIITSGGATNYA
		FW3	396	DSVAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	482	CNMESLSYRHYW
		FW4	568	GQGTQVTVSS
		AK VH	654	QVQLQESGGGLVRTGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
SID1	1	FW1	53	QVQLQESGGGLVRPGGSLRLSCTASG

R3aP 4A5		CDR1	139	SIFDIARGN
		FW2	225	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	311	AIITSGGATNYA
		FW3	397	DSVAGRFTISRDTAWKALYLMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	483	CNMESLSYRHYW
		FW4	569	GQGTQVTVSS
		AK VH	655	QVQLQESGGGLVLRPGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDTAWKALYLMNSLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
3HC DS11 5	1	FW1	54	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	140	SIFDIARGN
		FW2	226	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	312	AIVTSGGATNYA
		FW3	398	DSVAGRFTISRDTAWKALYLMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	484	CNMESLSYRHYW
		FW4	570	GQGTQVTVSS
		AK VH	656	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELV AIVTSGGATNYADS VAGRFTISRDTAWKALYLMNSLKPEDTAVY FCNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
SID1 R3aP 4F3	1	FW1	55	QVQLQESGGGLVQPGESLRLSCTASG
		CDR1	141	SIFDIARGN
		FW2	227	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	313	AIITSGGATNYA
		FW3	399	DSVAGRFTISRDTAWKALYLMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	485	CNMESLSYRHYW
		FW4	571	GQGTQVTVSS
		AK VH	657	QVQLQESGGGLVQPGESLRLSCTASGSIFDIAR GNWYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDTAWKALYLMNSLKPEDTAVYFC

				NMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
SID1 R3aP 7A2	1	FW1	56	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	142	SIFDIARGN
		FW2	228	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	314	AIITSGGATNYA
		FW3	400	DSVAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	486	CNMESLSYRHYW
		FW4	572	GKGTQVTVSS
		AK VH	658	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGKGTQVTVSS
SID1 R3P6 G10	1	FW1	57	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	143	SIFDIARGN
		FW2	229	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	315	AIITSGGATNYA
		FW3	401	DSVAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	487	CNMESLSYRHYW
		FW4	573	GQGTQVTVSS
		AK VH	659	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
SID1 R2P1 B10	1	FW1	58	QVQLQESGGGSVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	144	SIFDIARGN
		FW2	230	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	316	AIITSGGATNYA
		FW3	402	DSVAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	488	CNMESLSYRHYW
		FW4	574	GQGTQVTVSS
		AK VH	660	QVQLQESGGGSVQPGGSLRLSCTASGSIFDIA

				RGNWYRQAPGKQRELVAITSSGGATNYADSV AGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
SID1 R3P4 B1	1	FW1	59	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASG
		CDR1	145	SIFDIARGN
		FW2	231	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	317	AIITSSGGATNYA
		FW3	403	DSVAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	489	CNMESLSYRHYW
		FW4	575	GQGTQVTVSS
		AK VH	661	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAITSSGGATNYADSV AGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
2HC DS45	1	FW1	60	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTASG
		CDR1	146	SIFDIARGN
		FW2	232	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	318	AIVTSSGGATNYA
		FW3	404	DSVAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	490	CNMESLSYRHYW
		FW4	576	GQGTQVTVSS
		AK VH	662	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAIVTSSGGATNYADS VAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTAVY FCNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
3HC DS10 8	1	FW1	61	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTASG
		CDR1	147	SIFDIARGN
		FW2	233	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	319	AIITSSGGATNYA
		FW3	405	DSVAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	491	CNMESLSYRHYW

		FW4	577	GQGTQVTVSS
		AK VH	663	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
SID1 R2P6 E2	1	FW1	62	QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	148	SIFDIARGN
		FW2	234	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	320	AIITSGGATNYA
		FW3	406	DSVAGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	492	CNMESLSYRHYW
		FW4	578	GQGTQVTVSS
		AK VH	664	QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCTASGSIFDIA RGNWYRQAPGKQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDTAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLSYRHYWGQGTQVTVSS
2HC DS10 1	1	FW1	63	QVQLQESGGGLVHPGGSLRLSCTASG
		CDR1	149	SIFDIVRGS
		FW2	235	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	321	AIITSGGATNYA
		FW3	407	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYL
		CDR3	493	CNMESLRYRNYW
		FW4	579	GQGTQVTVSS
		AK VH	665	QVQLQESGGGLVHPGGSLRLSCTASGSIFDIV RGSWYRQAPGKQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYL CNMESLRYRNYWGQGTQVTVSS
3HC DS59	1	FW1	64	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	150	SIFDIVRGS
		FW2	236	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	322	AIITSGGATNYA
		FW3	408	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA

				VYL
		CDR3	494	CNMESLRYRNYW
		FW4	580	GQGTQVTVSS
		AK VH	666	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIV RGSWYRQAPGKQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYL CNMESLRYRNYWGQGTQVTVSS
SID1 R2P1 0E12	1	FW1	65	QVQLQESGGGLVLRPGGSLRLSCTASG
		CDR1	151	SIFDIVRGS
		FW2	237	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	323	AIITSGGATNYA
		FW3	409	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	495	CNMESLRYRHYW
		FW4	581	GQGTQVTVSS
		AK VH	667	QVQLQESGGGLVLRPGGSLRLSCTASGSIFDIV RGSWYRQAPGKQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLRYRHYWGQGTQVTVSS
SID1 R2P1 3A9	1	FW1	66	QVQLQESGGGLVQTGGPLRLSCTASG
		CDR1	152	SIFDIVRGS
		FW2	238	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	324	AIITSGGATNYA
		FW3	410	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	496	CNMESLRYRHYW
		FW4	582	GQGTQVTVSS
		AK VH	668	QVQLQESGGGLVQTGGPLRLSCTASGSIFDIV RGSWYRQAPGKQRELVAITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLRYRHYWGQGTQVTVSS
SID1 R2P1 7C8	1	FW1	67	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASG
		CDR1	153	SIFDIVRGS
		FW2	239	WYRQAPGKQRELV

		CDR2	325	AIITSGGATNYA
		FW3	411	DSVAGRFTISRDSA WKALYLQVNSLKP EDTAVYF
		CDR3	497	CNMESLRYRHYW
		FW4	583	GQGTQVTVSS
		AK VH	669	QVQLQESGGGLVQ TGGSLRLSCTAS GSIFDIV RGSWYRQAPGKQ RELVAITSGGATN YADSV AGRFTISRDSA WKALYLQVNSLKP EDTAVYF CNMESLRYRHYW GQGTQVTVSS
3HC DS17 1	1	FW1	68	QVQLQESGGGLVQ TGGSLRLSCTASG
		CDR1	154	SIFDIVRGS
		FW2	240	WYRQAPGKQREL V
		CDR2	326	AIITSGGATNYA
		FW3	412	DSVAGRFTISRDSA WKALYLQMDSLKP EDTAVYF
		CDR3	498	CNMESLRYRHYW
		FW4	584	GQGTQVTVSS
		AK VH	670	QVQLQESGGGLVQ TGGSLRLSCTAS GSIFDIV RGSWYRQAPGKQ RELVAITSGGATN YADSV AGRFTISRDSA WKALYLQMDSLKP EDTAVYF CNMESLRYRHYW GQGTQVTVSS
3HC DS17 3	1	FW1	69	QVQLQESGGGLVQ PGGSLRLSCTASG
		CDR1	155	SIFDIVRGS
		FW2	241	WYRQAPGKQREL V
		CDR2	327	AIITSGGATNYA
		FW3	413	DSVAGRFTISRDSA WKALYLQMNSLKP EDTAVYF
		CDR3	499	CNMESLRYRHYW
		FW4	585	GQGTQVTVSS
		AK VH	671	QVQLQESGGGLVQ PGGSLRLSCTAS GSIFDIV RGSWYRQAPGKQ RELVAITSGGATN YADSV AGRFTISRDSA WKALYLQMNSLKP EDTAVYF CNMESLRYRHYW GQGTQVTVSS
SID1	1	FW1	70	QVQLQESGGGLVQ TGGSLRLSCTASG

R3P1 5F9		CDR1	156	SIFDIVRGS
		FW2	242	WYRQAPGKQRELV
		CDR2	328	AIITSGGATNYA
		FW3	414	DSVAGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTA VYF
		CDR3	500	CNMESLRYRHYW
		FW4	586	GQGTQVTVSS
		AK VH	672	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCTASGSIFDIV RGSWYRQAPGKQRELVAIITSGGATNYADSV AGRFTISRDSAWKALYLQMNSLKPEDTAVYF CNMESLRYRHYWGQGTQVTVSS
3HC DS17 6	2	FW1	71	QVQLQESGGGLVEPGESLTLSCVASG
		CDR1	157	LSFDRYAIG
		FW2	243	WFRQAPGKEREV
		CDR2	329	ACISSKGGLTKYA
		FW3	415	DSVKGRFTISRDNNEKNTTYLQMNSLKPEDTA VYY
		CDR3	501	CAAAGPPDDCSVPGYYGLNYW
		FW4	587	GKGTQVTVSS
		AK VH	673	QVQLQESGGGLVEPGESLTLSCVASGLSFDRY AIGWFRQAPGKEREVACISSKGGLTKYADS VKGRFTISRDNNEKNTTYLQMNSLKPEDTAVY YCAAAGPPDDCSVPGYYGLNYWGKGTQVTV SS
3HC DS16 5	2	FW1	72	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
		CDR1	158	FTLERYAVG
		FW2	244	WFRQAPGKEREV
		CDR2	330	SCVSSSGDITKYA
		FW3	416	DSAKGRFTISRDNNAKNMAYLQMNSLKPEDTA VYY
		CDR3	502	CAAAGPADDCSVHGYYGLNYW
		FW4	588	GKGTQVTVSS
		AK VH	674	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLER YAVGWFRQAPGKEREVSCVSSSGDITKYAD

				SAKGRFTISRDNAMAYLQMNSLKPEDTAV YYCAAAGPADDCSVHGYYGLNYWGKGTQV TVSS
SID1 R3P6 F10	2	FW1	73	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
		CDR1	159	FTLEHYSIG
		FW2	245	WFRQAPGKDLEGV
		CDR2	331	SCITSSGGIPKYA
		FW3	417	DSVKGRFIISRDNAMKMGYLQMNSLKPEDTA VYY
		CDR3	503	CGAATPDDDCSVAGHYGLNYW
		FW4	589	GKGTQVTVSS
		AK VH	675	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEH YSIGWFRQAPGKDLEGVSCITSSGGIPKYADS VKGRFIISRDNAMKMGYLQMNSLKPEDTAVY YCGAATPDDDCSVAGHYGLNYWGKGTQVT VSS
SID1 R2P2 0C4	2	FW1	74	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
		CDR1	160	FTLEHYSMG
		FW2	246	WFRQAPGKDLEGV
		CDR2	332	SCITSSGGIPKYA
		FW3	418	DSVKGRFIISRDNAMKNTGYLQMNSLKPEDTA VYY
		CDR3	504	CGAATPDDDCSVPGHYGLNYW
		FW4	590	GKGTQVTVSS
		AK VH	676	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEH YSMGWFRQAPGKDLEGVSCITSSGGIPKYADS VKGRFIISRDNAMKNTGYLQMNSLKPEDTAVY YCGAATPDDDCSVPGHYGLNYWGKGTQVT SS
3HC DS12 4	2	FW1	75	QVQLQESGGGFVQPGGSLQLSCAVSG
		CDR1	161	RSRDYYYSIN
		FW2	247	WFRQAPGKREGV
		CDR2	333	SCISSGGITKYA
		FW3	419	DSVKGRFIIARDNTKNRAYLQMSSLKPEDTAV

				YY
		CDR3	505	CAAAGPPDDCSVPGYYGLNYW
		FW4	591	GKGTQVTVSS
		AK VH	677	QVQLQESGGGFVQPGGSLQLSCAVSGRSRDY YSINWFRQAPGKEREGVSCISSSGGITKYADS VKGRFIIARDNTKNRAYLQMSSLKPEDTAVY YCAAAGPPDDCSVPGYYGLNYWGKGTQVTV SS
3HC DS13 7	2	FW1	76	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAVSG
		CDR1	162	FTLEHYTIG
		FW2	248	WFRQAPGKELEGV
		CDR2	334	SCITSSGGVVKYA
		FW3	420	DSVKGRFIISRDNTNNRAFLQMSSLKPEDTAV YY
		CDR3	506	CAAAGPPDDCSVPGYYGLNYW
		FW4	592	GKGTQVTVSS
		AK VH	678	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLEH YTIGWFRQAPGKELEGVSCITSSGGVVKYADS VKGRFIISRDNTNNRAFLQMSSLKPEDTAVYY CAAAGPPDDCSVPGYYGLNYWGKGTQVTVS S
SID1 R2P1 7H11	2	FW1	77	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVAPG
		CDR1	163	FTLDKYAIG
		FW2	249	WFRQAPGKELEGV
		CDR2	335	SCITSSSGVVKYA
		FW3	421	DSVKGRFIISRDNTNNRAFLQMSSLKPEDTAV YY
		CDR3	507	CAAAGPPDDCSVPGYYGLNYW
		FW4	593	GQGTQVTVSS
		AK VH	679	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVAPGFTLDK YAIGWFRQAPGKELEGVSCITSSSGVVKYADS VKGRFIISRDNTNNRAFLQMSSLKPEDTAVYY CAAAGPPDDCSVPGYYGLNYWGQGTQVTVS S

SID1 R2P2 1B5	2	FW1	78	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASG
		CDR1	164	FTLDKYAIG
		FW2	250	WFRQAPGKELEGV
		CDR2	336	SCITSSGGVVKYA
		FW3	422	DSVKGRFIISRDNTNNRAFLQMSSLKPEDTAV YY
		CDR3	508	CAAAGPPDDCSVPGYYGLNYW
		FW4	594	GKGTQVTVSS
		AK VH	680	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTLDK YAIGWFRQAPGKELEGVSCITSSGGVVKYAD SVKGRFIISRDNTNNRAFLQMSSLKPEDTAVY YCAAAGPPDDCSVPGYYGLNYWGKGTQVTV SS
2HC DS18	2	FW1	79	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCGASD
		CDR1	165	FTLENYAIG
		FW2	251	WFRQAPGKEREV
		CDR2	337	SCITSSGGITKYA
		FW3	423	DSVKGRFIISRDNTKNRAYLQMNSLKPEDTAV YY
		CDR3	509	CAAAGPPDDCSVPGYYGLNYW
		FW4	595	GKGTQVTVSS
		AK VH	681	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCGASDFTLEN YAIGWFRQAPGKEREVSCITSSGGITKYADS VKGRFIISRDNTKNRAYLQMNSLKPEDTAVY YCAAAGPPDDCSVPGYYGLNYWGKGTQVTV SS
3HC DS13 2	2	FW1	80	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASD
		CDR1	166	FNLERYAIN
		FW2	252	WFRQAPGKEREV
		CDR2	338	LCITSSGGITKYA
		FW3	424	NSVKGRFIISRDNTKNRAYLQMNSLKPEDTAV YY
		CDR3	510	CAAAGPPDDCSVPGYYGLNYW
		FW4	596	GKGTQVTVSS

		AK VH	682	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASDFNLER YAINWFRQAPGKEREGLVLCITSSGGITKYANS VKGRFIISRDNTKNRAYLQMNSLKPEDTAVY YCAAAGPPDDCSVPGYYGLNYWGKGTQVTV SS
3HC DS13 1	2	FW1	81	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASG
		CDR1	167	FTLDYYAIN
		FW2	253	WFRQAPGKEREGLV
		CDR2	339	LCITSNNGGITKYA
		FW3	425	DSVKGRFIISRDNTKNRAYLQMNSLKPEDTAV YY
		CDR3	511	CAAAGPPDDCSVPGYYGLNYW
		FW4	597	GKGTQVTVSS
		AK VH	683	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTLDY YAINWFRQAPGKEREGLVLCITSNNGGITKYADS VKGRFIISRDNTKNRAYLQMNSLKPEDTAVY YCAAAGPPDDCSVPGYYGLNYWGKGTQVTV SS
2HC DS17	3	FW1	82	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG
		CDR1	168	FTFDAYAIG
		FW2	254	WFRQAPGKEREGLV
		CDR2	340	ICLSPSDGSTYYA
		FW3	426	DSVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPEDTA VYY
		CDR3	512	CAAPSWCSLKADFGSW
		FW4	598	GQGTQVTVSS
		AK VH	684	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDA YAIGWFRQAPGKEREGLVCLSPSDGSTYYADS VKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVY YCAAPSWCSLKADFGSWGQGTQVTVSS
SID1 R2P2 0C6	3	FW1	83	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
		CDR1	169	FTFDAYAIG
		FW2	255	WFRQAPGKEREGLV
		CDR2	341	ICLSPSDGSTYYA

		FW3	427	DSVKGRFTISSDNAKNTVYQLQMNSLKPEDTA VYY
		CDR3	513	CAAPSWCSLKADFGSW
		FW4	599	GQGTQVTVSS
		AK VH	685	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDA YAIGWFRQAPGKEREVCLSPSDGSTYYADS VKGRFTISSDNAKNTVYQLQMNSLKPEDTAVY YCAAPSWCSLKADFGSWGQGTQVTVSS
SID1 R3P1 5G3	4	FW1	84	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG
		CDR1	170	SIIRDNVMA
		FW2	256	WHRQAPGKQRELV
		CDR2	342	AIINIGGSGNVD
		FW3	428	DSVEGRFTISRDNKAKNMVYQLQMNSLKPEDTA VYY
		CDR3	514	CNVYYRDLW
		FW4	600	GQGTQVTVSS
		AK VH	686	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIIRDN VMAWHRQAPGKQRELVAIINIGGSGNVDDSV EGRFTISRDNKAKNMVYQLQMNSLKPEDTAVYY CNVYYRDLWGQGTQVTVSS
SID1 R3P1 6C6	4	FW1	85	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASK
		CDR1	171	SIIRDNVMA
		FW2	257	WHRQAPGKQRELV
		CDR2	343	AIINTGGSANVD
		FW3	429	DSVKGRFTISRDNKAKNMVYQLQMNNLKPEDT AVYY
		CDR3	515	CNVYYRDLW
		FW4	601	GQGTQVTVSS
		AK VH	687	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASKSIIRDN VMAWHRQAPGKQRELVAIINTGGSANVDDS VKGRFTISRDNKAKNMVYQLQMNNLKPEDTAV YYCNCVYYRDLWGQGTQVTVSS
3HC DS28	6	FW1	86	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASG
		CDR1	172	SIFSATRME

	FW2	258	WYRQAPGKQRELV
	CDR2	344	AIVTSGGRTNYA
	FW3	430	DSVNGRFTISRDNKNTLYLQMNNLKPEDTAVYY
	CDR3	516	CKFERYDYVNYW
	FW4	602	GRGTQVTVSS
	AK VH	688	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSIFSAT RMEWYRQAPGKQRELVAIVTSGGRTNYADS VNGRFTISRDNKNTLYLQMNNLKPEDTAVY YCKFERYDYVNYWGRGTQVTVSS

Таблица 6. Таблица иллюстративных последовательностей

SEQ ID NO:	Последовательность
780	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASG SIFSATRMEWYRQAPGKQRELVAIVTSGGRTNYADSVNGRFTISRDN KNTLYLQMNNLKPEDTAVYYCKFERYDYVNYWGRGTQVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSAEKDEL
781	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASG SIFSATRMEWYRQAPGKQRELVAIVTSGGRTNYADSVNGRFTISRDN KNTLYLQMNNLKPEDTAVYYCKFERYDYVNYWGRGTQVTVSSTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLA GTCGVLLLSLVITLYLYKYKSRRSFIDEKKMP
1230	HRDGIYMVHIQVTLAICSSTAS
1231	ASRHHPTTLAVGICSPASRSISL
1243	SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ (линкер SG <sub>3</sub> (SG <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> SG <sub>3</sub> SLQ)

Таблица 7. Таблица иллюстративных последовательностей связывающих CD70

КОМПОНЕНТОВ

Название	SEQ ID NO:	Компонент	Последовательность
ТС7-III-A11	783	VH	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYMH VRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAIEPGYCSGGSCYP DAFDIWGQGTTVTVSS
	836	CDRH1	GYTFTSYMH
	889	CDRH2	GIINPSGGSTSYAQK
	942	CDRH3	AIEPGYCSGGSCYPDAFDI

	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	995	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSDYVYWYQ RVPGTAPKLLIYRDNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSDDDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKVTVL
	1048	CDRL1	SGSSSNIGSDYVY
	1101	CDRL2	YRDNQRPS
	1154	CDRL3	AAWDDSLSGWV
<b>TC6- IV- B08</b>	784	VH	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGHPYYYGMD VWGQGTITVTVSS
	837	CDRH1	GFTFSSYAMH
	890	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	943	CDRH3	ARDGHPYYYGMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	996	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVG DYNVSWY QHHPGKAPKLMYDVSNRPSGVS NRFSGSKSGNTASL TISGLQAEDEADYYCGSYTGSDTWVFGGGTKVTVL
	1049	CDRL1	TGTSSDVG DYNVVS
	1102	CDRL2	YDVS NRPS
	1155	CDRL3	GSYTGSDTWV
<b>TC4- I-C11</b>	785	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSY AISWV RQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVTPPGWLG NDVWGKGTITVTVSS
	838	CDRH1	GGTFSSY AIS
	891	CDRH2	GWISAYNGNTNYAQK
	944	CDRH3	ARVTPPGWLGNDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	997	VL	SYELMQSPSVS VAPGQTARITCGGRDIGSKSVHWYQQ KPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERLSGSNFGNEATLTIS RVEAGDEGDYFCQVWDSSTDV VFGGGTKVTVL
	1050	CDRL1	GGRDIGSKSVH
	1103	CDRL2	YDDSDRPS

	1156	CDRL3	QVWDSSTDVV
<b>TC4- XIII- A01</b>	786	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMAWINPNTGDTNYAQKFQGRVT MTRDTSINTAYIELSRLTSDDTAVYYCARVGDYYDRS GYRRHDAFDIWGQGTMVTVSS
	839	CDRH1	GYTFTGYYMN
	892	CDRH2	AWINPNTGDTNYAQK
	945	CDRH3	ARVGDYYDRSGYYRHDAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	998	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAMDEADYYCQAWDSSTGVVFGGGTKVTVL
	1051	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1104	CDRL2	YGKNNRPS
	1157	CDRL3	QAWDSSTGVV
<b>TC7- V- G06</b>	787	VH	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYWGQGLV TVSS
	840	CDRH1	GGTFSSYAIS
	893	CDRH2	GWISAYNGNTNYAQK
	946	CDRH3	ARDDY
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	999	VL	SYELTQPPSVSVAPGKTARITCSGDVLGENYADWYQQ KPGQAPLVIYEDSERYPGIPERFSGSTSGNTTTLTISR VLTEDADYYCLSGDEDNRVFGGGTKLTVL
	1052	CDRL1	SGDVLGENYAD
	1105	CDRL2	YEDSERYP
	1158	CDRL3	LSGDEDNRV
<b>TC7- IV- E09</b>	788	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRRPYWYFDLWGRG TLVTVSS
	841	CDRH1	GGSFSGYYWS

	894	CDRH2	GEINHSGSTNYNPS
	947	CDRH3	ARSRRPYWYFDL
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1000	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWY RQHPPGKAPKLMYDVTNRPSGVSNRFSGSKSGNTASL TISGLQAEDEADYYCSSSSISATWVFGGGTKVTVL
	1053	CDRL1	TGTSSDVGGYNSVS
	1106	CDRL2	YDVTNRPS
	1159	CDRL3	SSSSISATWV
<b>TC7- III- G11</b>	789	VH	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNSGYDSYDYYG MDVWGQGTTVTVSS
	842	CDRH1	GFTFSSYAMH
	895	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	948	CDRH3	ATNSGYDSYDYYGMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1001	VL	QSVLTQPPSMGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHW YQHLPGTGPKLLIHGNTNRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AITGLQAEDEADYYCQSYDNSLGGYVVFSGGGTKVTV L
	1054	CDRL1	TGSSSNIGAGYDVH
	1107	CDRL2	HGNTNRPS
	1160	CDRL3	QSYDNSLGGYVV
<b>TC7- V- H10</b>	790	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRRPYWYFDLWGRG TLVTVSS
	843	CDRH1	GGSFSGYYWS
	896	CDRH2	GEINHSGSTNYNPS
	949	CDRH3	ARSRRPYWYFDL
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1002	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWY RQHPPGKAPKLMYDVTNRPSGVSNRFSGSKSGNTASL

			TISGLQAEDEADYYCSSSSISATWVFGGGTKLTVL
	1055	CDRL1	TGTSSDVGGYNSVS
	1108	CDRL2	YDVTNRPS
	1161	CDRL3	SSSSISATWV
<b>TC7- VIII- E07</b>	791	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRRPYWYFDLWGRG TLVTVSS
	844	CDRH1	GGSFSGYYWS
	897	CDRH2	GEINHSGSTNYPNPS
	950	CDRH3	ARSRRPYWYFDL
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1003	VL	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYDSVSWY QQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASL TISGLQAEDEADYYCSSYTSSTTLGWIFGGGKTLTVL
	1056	CDRL1	TGTSSDVGGYDSVS
	1109	CDRL2	YDVSNRPS
	1162	CDRL3	SSYTSSTTLGWI
<b>TC6- VII- A09</b>	792	VH	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAGAPPHYYYG MDVWGQGTTVTVSS
	845	CDRH1	GFTFSSYGMH
	898	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	951	CDRH3	AKAGAPPHYYYGMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1004	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYDYVSWY QQHPGKAPKLMYEVTDPRPSGIPNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSYTYTSTLEVFGGGTKVTVL
	1057	CDRL1	TGTSSDVGGYDYVS
	1110	CDRL2	YEVTDPRPS
	1163	CDRL3	SSYTYTSTLEV
<b>TC4- VII-</b>	793	VH	QLQLQESGPGLVKPSGTLTLCAVSGGSISSSNWWSW VRQPPGKGLEWIGEIYHSGSTNYPNPSLKSRTISVDKS

<b>F02</b>			KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGPGPDPNDAFDIWG QGMVTVSS
	846	CDRH1	GGSISSSNWWS
	899	CDRH2	GEIYHSGSTNYNPS
	952	CDRH3	AGPGPDPNDAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1005	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ LPGTAPKLLIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVL
	1058	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1111	CDRL2	YQDSKRPS
	1164	CDRL3	QAWDSSTAV
<b>TC4- VII- C04</b>	794	VH	QVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLVYYYGMDV WGQGTTVTVSS
	847	CDRH1	GFTFDDYAMH
	900	CDRH2	SGISWNSGSIGYADS
	953	CDRH3	ARDLVYYYGMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1006	VL	QSVLTQPPSVSGTPGQGVSISSCSGSSSNIGWKTWNWYQ QVPGMAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSATSASLAI SGLQSEDEADYYCASWDASVNAPVFGGGTKLTVL
	1059	CDRL1	SGSSSNIGWKTWN
	1112	CDRL2	YSDNQRPS
	1165	CDRL3	ASWDASVNAPV
<b>TC7- VII- H02</b>	795	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRRPYWYFDLWGQG TLVTVSS
	848	CDRH1	GGSFSGYYWS
	901	CDRH2	GEINHSGSTNYNPS
	954	CDRH3	ARSRRPYWYFDL
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS

	1007	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGAYDSVSWY LQYPGKAPKLMYDVTNRPSGVSNRFSGSKSGNTASL TISGLQAEDEAHYYCISY TASSTYVVFGGGTKLTVL
	1060	CDRL1	TGTSSDVGAYDSVS
	1113	CDRL2	YDVTNRPS
	1166	CDRL3	ISY TASSTYVV
<b>TC7- VII- D05</b>	796	VH	QMQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDALWDTATFD YWGQGLVTVSS
	849	CDRH1	GFTFSSYAMH
	902	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	955	CDRH3	ARDALWDTATFDY
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1008	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTIG AQAEDADYYCNSRDSSGNPWVVFGGGTKLTVL
	1061	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1114	CDRL2	YGKNNRPS
	1167	CDRL3	NSRDSSGNPWV
<b>TC7- VII- C02</b>	797	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSPLWFGPPDAFDI WGQTMVTVSS
	850	CDRH1	GGSFSGYYWS
	903	CDRH2	GEINHSGSTNYPNPS
	956	CDRH3	ARSPLWFGPPDAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1009	VL	QSALTQPPSASGSPGQSVSISCTGTSSDVGGINYVSWY QQHPGKAPKLIYDVKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SGTQAMDEADYYCQAWDSSTEVVVFGGGTKVTVL
	1062	CDRL1	TGTSSDVGGINYVS
	1115	CDRL2	YDVKRPS
	1168	CDRL3	QAWDSSTEVV

<b>TC7-III-D10</b>	798	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISW VRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMT TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSWYYYY GMDVWGQGTTVTVSS
	851	CDRH1	GYTFTSYGIS
	904	CDRH2	GWISAYNGNTNYAQK
	957	CDRH3	ARDSSSWYYYYGMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1010	VL	SYELTQPPSVSVSPGQTARISCSGDALPNQYAYWYQQ KPGQAPVLVIYQDSERPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISG VQAEDADYCYQSADTYGTSWVFGGGTKLTVL
	1063	CDRL1	SGDALPNQYAY
	1116	CDRL2	YQDSERPS
	1169	CDRL3	QSADTYGTSWV
<b>TC4-VII-G08</b>	799	VH	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLSYDYGFDY WGQGTLVTVSS
	852	CDRH1	GFTFSSYAMH
	905	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	958	CDRH3	ARDLSYDYGFDY
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1011	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAEDADYCYNSRDSSGNHLVVFSGGKTKVTVL
	1064	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1117	CDRL2	YGKNNRPS
	1170	CDRL3	NSRDSSGNHLVV
<b>TC4-I-C10</b>	800	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWMGIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAISRTE SYVMDVWG QGTTVTVSS
	853	CDRH1	GYSFTSYWIG
	906	CDRH2	GIIYPGDS DTRYSPS

	959	CDRH3	AISRTESYVMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1012	VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSW YQQHPGKAPKLMYDVTNRPSGVPDRFSASKSDNTAT LTVSGVQAEDEADYYCSSYAGSHELFGGGTKLTVL
	1065	CDRL1	TGTSSDVGGYNYVS
	1118	CDRL2	YDVTNRPS
	1171	CDRL3	SSYAGSHEL
<b>TC7- VIII- C02</b>	801	VH	QVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGAYYYGVS MDVWGQGTTVTVSS
	854	CDRH1	GFTFSSYGMH
	907	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	960	CDRH3	AKGAYYYGVSVMGMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1013	VL	SYELTQPVSVSVALGQTARLTCAGNNIGSKNVHWYQ QKPSQAPVLVIYNDNIRPNFGIPERFSGSNSGNTATLTI SSAQAGDEADYYCQVWDSSTAIEVFGGGTKLTVL
	1066	CDRL1	AGNNIGSKNVH
	1119	CDRL2	YNDNIRPNF
	1172	CDRL3	QVWDSSTAIEV
<b>TC7- V- G04</b>	802	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMH WVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGWVT MTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDPGWSYY YGMDVWGQGTTVTVSS
	855	CDRH1	GYTFTGYYMH
	908	CDRH2	GWINPNSGGTNYAQK
	961	CDRH3	ARDPGWSYYYGMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1014	VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSW YQQHPGKAPQLMIFEVSYRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLQSEDEADYYCAAWDDSLKGYVFGTGKLT LTVL
	1067	CDRL1	TGTSSDVGGYNYVS

	1120	CDRL2	FEVSYRPS
	1173	CDRL3	AAWDDSLKGYV
<b>TC7- VI- F11</b>	803	VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYGFDYWGQ GTLVTVSS
	856	CDRH1	GFTFSSYAMH
	909	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	962	CDRH3	ARDGYGFDY
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1015	VL	SYELTQSPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQ KPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEADYYCQVWDSSTPYVFGTGTKLTVL
	1068	CDRL1	GGNNIGSKSVH
	1121	CDRL2	YDDSDRPS
	1174	CDRL3	QVWDSSTPYV
<b>TC1. 2-I- F07-6</b>	804	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWMGIIYPGESDTRYSPSFQGQVTISADKS ISTAYLQWSSLKASDTAMYVCARNYYDRSGYVDAF DIWGQGTMTVTVSS
	857	CDRH1	GYSFTSYWIG
	910	CDRH2	GIIYPGESDTRYSPS
	963	CDRH3	ARNYYDRSGYVDAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1016	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRRFYASWHQQ KPGQAPIVVMYAENNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAEDATYYCNSRDSSGNRHVFSGTGTKLTVL
	1069	CDRL1	QGDSLRRFYAS
	1122	CDRL2	YAENNRPS
	1175	CDRL3	NSRDSSGNRHV
<b>TC7- VII- E06</b>	805	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVARGKGAFDIWGQG TMVTVSS

	858	CDRH1	GGSFSGYYWS
	911	CDRH2	GEINHSGSTNYNPS
	964	CDRH3	ARVARGKGAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1017	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNFVSWYQ QHPGKAPKLMIEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTI SGLQAEDEADYYCSSYTSSSAWVFGGGTKLTVL
	1070	CDRL1	TGTSSDIGGYNFVS
	1123	CDRL2	YEVSNRPS
	1176	CDRL3	SSYTSSSAWV
<b>TC1. 2-I- C08- 1</b>	806	VH	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISW VRQAPGQGLEWGWNPNTGGTDYAQKFQGRVTITR DTSITTGYMELSRRLSDDTAVYYCARHYYYGMDVWG QGTTVTVSS
	859	CDRH1	GYTFTSYGIS
	912	CDRH2	GWNPNTGGTDYAQK
	965	CDRH3	ARHYYYGMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1018	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISS LQPEDIATYYCQQYDNLPLTFGGGKVEIK
	1071	CDRL1	QASQDISNYLN
	1124	CDRL2	YDASNLET
	1177	CDRL3	QQYDNLPLT
<b>TC4- V- E07</b>	807	VH	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDSEFDYGVDV WGKGTTVTVSS
	860	CDRH1	GFTFSSYAMH
	913	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	966	CDRH3	ARDESEFDYGVDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1019	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLGRFYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG

			AQAEDEADYYCNSRDSSGNHLVVFGGGTKLTVL
	1072	CDRL1	QGDSLGRFYAS
	1125	CDRL2	YGKNNRPS
	1178	CDRL3	NSRDSSGNHLVV
<b>TC4- I-G08</b>	808	VH	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDESFDYGVDV WGKGTTVTVSS
	861	CDRH1	GFTFSSYAMH
	914	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	967	CDRH3	ARDESFDYGVDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1020	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAEDEADYYCNSRDSSGNHLVVFGGGTKLTVL
	1073	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1126	CDRL2	YGKNNRPS
	1179	CDRL3	NSRDSSGNHLVV
<b>TC6- VI- D04</b>	809	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMH WVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGWVT MTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARAGGWYRE SSDAFDIWGQGMVTVSS
	862	CDRH1	GYTFTGYMH
	915	CDRH2	GWINPNSGGTNYAQK
	968	CDRH3	ARAGGWYRESSDAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1021	VL	SYELTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQ QLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGTGKIKVTVL
	1074	CDRL1	SGSSSNIGSNYVY
	1127	CDRL2	YRNNQRPS
	1180	CDRL3	AAWDDSLSGYV
<b>TC7- V-</b>	810	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK

<b>D10</b>			NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYRSYWF <sub>DL</sub> WGR GTLVTVSS
	863	CDRH1	GGSFSGYYWS
	916	CDRH2	GEINHSGSTNYNPS
	969	CDRH3	ARGGYRSYWF <sub>DL</sub>
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1022	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWY QHHPGKAPKLMYDVS <sub>DRPS</sub> GVSD <sub>RFS</sub> SGSKSGNTASL TISGLQAED <sub>EAD</sub> Y <sub>Y</sub> CSSYAGSNNVVF <sub>GGG</sub> TKVTVL
	1075	CDRL1	TGTSSDVGGYNSVS
	1128	CDRL2	YDVSDRPS
	1181	CDRL3	SSYAGSNNVV
<b>TC7- VI- D10</b>	811	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC <sub>AVY</sub> GGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSL <sub>KSR</sub> VTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVSR <sub>SRGAF</sub> DIWGQGT MVTVSS
	864	CDRH1	GGSFSGYYWS
	917	CDRH2	GEINHSGSTNYNPS
	970	CDRH3	ARVSR <sub>SRGAF</sub> DI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1023	VL	QSALTQPASVSGSPGQSLTISCTGTSSDVGVYNYVSW YQQHPGKAPKLMYDVGIRPSGVSNR <sub>FSG</sub> SKSGNTAS LTISGLQAED <sub>EAD</sub> Y <sub>Y</sub> CNSYTRSGTWVF <sub>GGG</sub> TKVTVL
	1076	CDRL1	TGTSSDVGVYNYVS
	1129	CDRL2	YDVGIRPS
	1182	CDRL3	NSYTRSGTWV
<b>TC7- VII- G05</b>	812	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC <sub>AVY</sub> GGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSL <sub>KSR</sub> VTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVSR <sub>SRGAF</sub> DIWGQGT MVTVSS
	865	CDRH1	GGSFSGYYWS
	918	CDRH2	GEINHSGSTNYNPS
	971	CDRH3	ARVSR <sub>SRGAF</sub> DI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS

	1024	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYDFVSWYQ QPPGKAPKLVIYEVNRRPSGLSNRFSGSRSGNTASLTV SGLQTEDEADYYCSSYAGSNNWVFGGGTKLTVL
	1077	CDRL1	TGTSSDIGGYDFVS
	1130	CDRL2	YEVNRRPS
	1183	CDRL3	SSYAGSNNWV
<b>TC6- VI- F05</b>	813	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMAWINPNTGDTNYAQKFQGRVT MTRDTSINTAYIELSRLTSDDTAVYYCARVGDYYDRS GYRHDADFIDWGQGTMTVTVSS
	866	CDRH1	GYTFTGYYMN
	919	CDRH2	AWINPNTGDTNYAQK
	972	CDRH3	ARVGDYYDRSGYYRHDADFID
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1025	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAMDEADYYCQAWDSSTVVVFGGGTKVTVL
	1078	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1131	CDRL2	YGKNNRPS
	1184	CDRL3	QAWDSSTVVV
<b>TC4- VIII- H08</b>	814	VH	EVQLVQSGGALVEPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSTQDYGMDV WGQGTITVTVSS
	867	CDRH1	GFTFSSYAMH
	920	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	973	CDRH3	ARDSTQDYGMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1026	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAEDADYYCNSRDSSGNHLVFGGGTKLTVL
	1079	CDRL1	QGDSLRYAS
	1132	CDRL2	YGKNNRPS
	1185	CDRL3	NSRDSSGNHLVV

<b>TC7- V- D08</b>	815	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVARGKGAFDIWGQG TMVTVSS
	868	CDRH1	GGSFSGYYWS
	921	CDRH2	GEINHSGSTNYPNPS
	974	CDRH3	ARVARGKGAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1027	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWY QQHPGKAPKLLIYEVSSRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTI SGLQAEDEADYYCNSYTNSGSWVFGGGTKVTVL
	1080	CDRL1	TGTSSDVGGYNYVS
	1133	CDRL2	YEVSSRPS
	1186	CDRL3	NSYTNSGSWV
<b>TC6- IV- A09</b>	816	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVSRSRGAFDIWGQGT MVTVSS
	869	CDRH1	GGSFSGYYWS
	922	CDRH2	GEINHSGSTNYPNPS
	975	CDRH3	ARVSRSRGAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1028	VL	SYELTQPPSVSGSPGQSITISCTGTSSDVGVYNYVSWY QQHPGKAPKLMIYEVSHRPSGVSNRFSGSKSDNTASL TISGLQAEDEADYYCTSYSSSTRWVFGGGTKVTVL
	1081	CDRL1	TGTSSDVGVYNYVS
	1134	CDRL2	YEVSHRPS
	1187	CDRL3	TSYSSSTRWV
<b>TC7- VI- H08</b>	817	VH	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMH WVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMT RDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGWETNDAFDI WGQGTMTVTVSS
	870	CDRH1	GYTFTSYMH
	923	CDRH2	GIINPSGGSTSYAQK

	976	CDRH3	ARGWETNDAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1029	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQKVTISCSGSNSNVGNHYLSWY QHLPGTAPRLLIFDNNKRPSGIPDRFSGSKSGASATLDI TGLQTGDEADYFCGTWDSRLNVWVFGGGTKLTVL
	1082	CDRL1	SGSNSNVGNHYLS
	1135	CDRL2	FDNNKRPS
	1188	CDRL3	GTWDSRLNVWV
<b>TC7- VII- G03</b>	818	VH	EVQLLESGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMNMW VRQAPGQGLEWMAWINPNTGDTNYAQKFQGRVTMT RDTSENTAYIELSRLTSDDTAVYYCARVGDYYDRSGY YRHDAFDIWGQGMVTVSS
	871	CDRH1	GYTFTGYMNM
	924	CDRH2	AWINPNTGDTNYAQK
	977	CDRH3	ARVGDYYDRSGYYRHDAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1030	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVL
	1083	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1136	CDRL2	YGKNNRPS
	1189	CDRL3	QAWDSSTAV
<b>TC7- VI- H02</b>	819	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMNM WVRQAPGQGLEWMAWINPNTGDTNYAQKFQGRVT MTRDTSENTAYIELSRLTSDDTAVYYCARVGDYYDRS GYRRHDAFDIWGQGMVTVSS
	872	CDRH1	GYTFTGYMNM
	925	CDRH2	AWINPNTGDTNYAQK
	978	CDRH3	ARVGDYYDRSGYYRHDAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1031	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLTRYYYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGTGTGKVTVL
	1084	CDRL1	QGDSLTRYYYAS

	1137	CDRL2	YGKNNRPS
	1190	CDRL3	QAWDSSTAV
<b>TC4- XVI- F01</b>	820	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSTQDYGMDV WGQGTMTVTVSS
	873	CDRH1	GFTFSSYAMH
	926	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	979	CDRH3	ARDSTQDYGMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1032	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRLNYASWYQQ KPGQAPVLVIFYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTIT GAQAEDADYYCNSRDSSGNHLVVFVGGGKLTVL
	1085	CDRL1	QGDSLRLNYAS
	1138	CDRL2	YGKNNRPS
	1191	CDRL3	NSRDSSGNHLVV
<b>TC7- VI- B06</b>	821	VH	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV RQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGELELTNWGQGT LVTVSS
	874	CDRH1	GFTFSSYGMH
	927	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	980	CDRH3	AKGELELTN
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1033	VL	SYELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQ KSGQAPVLVYDDTDRPSGTPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGTGKVTVL
	1086	CDRL1	GGNNIGSKSVH
	1139	CDRL2	YDDTDRPS
	1192	CDRL3	QAWDSSTAV
<b>TC4- XVI- H01</b>	822	VH	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWV RQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSTQDYGMDVW GQGTTVTVSS

	875	CDRH1	GFTFSSYAMH
	928	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	981	CDRH3	ARDSTQDYGMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1034	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ KPGQAPILVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAEDEADYYCNSRDSSGNLLYVFGTGTKLTVL
	1087	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1140	CDRL2	YGKNNRPS
	1193	CDRL3	NSRDSSGNLLYV
<b>TC7- VIII- G06</b>	823	VH	QVQLLES GGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWVSGITWNSGSIGYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVAARPFYYYG MDVWGQGTTVTVSS
	876	CDRH1	GFTFDDYAMH
	929	CDRH2	SGITWNSGSIGYADS
	982	CDRH3	AREVAARPFYYYGMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1035	VL	QSVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQ KPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS GTQAMDEADYYCQAWDSSTVFGGGTKLTVL
	1088	CDRL1	GGNNIGSKSVH
	1141	CDRL2	YDDSDRPS
	1194	CDRL3	QAWDSSTV
<b>TC7- VII- A03</b>	824	VH	QVQLQQSGPGLVKASETSLTCAVSGHSISSSNYWG IRQPPGKGLEWIGSIYHSGTTYYNPSLKSRTMSVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHGSGDLGYLEYWG QGTLVTVSS
	877	CDRH1	GHSISSSNYWG
	930	CDRH2	GSYHSGTTYYNPS
	983	CDRH3	ARHGSGDLGYLEY
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1036	VL	SYELTQSPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQ KPGQAPVLVIYYDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISR

			VEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVFGGGTKVTVL
	1089	CDRL1	GGNNIGSKSVH
	1142	CDRL2	YYDSDRPS
	1195	CDRL3	QVWDSSSDHPV
<b>TC4-IX-G04</b>	825	VH	QVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLGFGSGWYEY VDAFDIWGQGTMTVSS
	878	CDRH1	GFTFSSYAMH
	931	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	984	CDRH3	ARGLGFGSGWYEYVDAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1037	VL	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVS WYQQHPGKAPKLMIEVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASL TISGLQAEDEADYYCSSYRSNNTPWVFGGGTKLTVL
	1090	CDRL1	TGTSSDVGSYNLVS
	1143	CDRL2	YEVSKRPS
	1196	CDRL3	SSYRSNNTPWV
<b>TC7-VI-C03</b>	826	VH	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSEYGM DVWGQGTTVTVSS
	879	CDRH1	GFTFSSYAMH
	932	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	985	CDRH3	ARDGSEYGM
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1038	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAEDADYYCNSRDSSGNHLVVFGGGTKLTVL
	1091	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1144	CDRL2	YGKNNRPS
	1197	CDRL3	NSRDSSGNHLVV
<b>TC7-VII-</b>	827	VH	QVQLVQSGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRD

<b>A06</b>			NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGYSYGGTSFD YWGQGTLLVTVSS
	880	CDRH1	GFTFSSYAMS
	933	CDRH2	SAISGSGGSTYYADS
	986	CDRH3	AKDGYSYGGTSFDY
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1039	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYDYVSWY QQHPGKAPKLMIEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASL TISGLQAEDEADYYCSSYASSGSLFLGGGTKVTVL
	1092	CDRL1	TGTSSDVGGYDYVS
	1145	CDRL2	YEVSNRPS
	1198	CDRL3	SSYASSGSL
<b>TC7- V- H07</b>	828	VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMHW VRQAPGKGLEWVAIISYDGTNKYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDPAYGSYYYY GMDVWGQGTTLVTVSS
	881	CDRH1	GFTFSNYAMH
	934	CDRH2	AISYDGTNKYYADS
	987	CDRH3	ARDPAYGSYYYYGMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1040	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQ QLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVVFVGGGTKVTVL
	1093	CDRL1	SGSSSNIGSNTVN
	1146	CDRL2	YSNNQRPS
	1199	CDRL3	AAWDDSLNGVV
<b>TC7- VII- E11</b>	829	VH	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSSGYYYYGSDA FDIWGQGTMTVTVSS
	882	CDRH1	GFTFSSYAMH
	935	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	988	CDRH3	ARDSSGYYYYGSDAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS

	1041	VL	SYELTQPPSVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAEDEADYYCNSRDSSGNPWVFGGGTKVTVL
	1094	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1147	CDRL2	YGKNNRPS
	1200	CDRL3	NSRDSSGNPWV
<b>TC4- XII- A11</b>	830	VH	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSEDIYGMDEV WGQGTITVTVSS
	883	CDRH1	GFTFSSYAMH
	936	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	989	CDRH3	ARDGSEDIYGMDEV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1042	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAEDEADYYCNSRDSSGNHLVVFVGGGGTKVTVL
	1095	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1148	CDRL2	YGKNNRPS
	1201	CDRL3	NSRDSSGNHLVV
<b>TC6- I-F03</b>	831	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMAWINPNTGDTNYAQKFQGRVT MTRDTSINTAYIELSRLTSDDTAVYYCARVGDYYDRS GYYRHDAFDIWGQGTMTVTVSS
	884	CDRH1	GYTFTGYYMN
	937	CDRH2	AWINPNTGDTNYAQK
	990	CDRH3	ARVGDYYDRSGYYRHDAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1043	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYYCQAWDSSTVFGGGTKVTVL
	1096	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1149	CDRL2	YGKNNRPS
	1202	CDRL3	QAWDSSTV

<b>TC4-III-A04</b>	832	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMN WVRQAPGQGLEWMAWINPNTGDTNYAQKFQGRVT MTRDTSINTAYIELSRLTSDDTAVYYCARVGDYYDRS GYRRHDAFDIWGQGTMTVTVSS
	885	CDRH1	GYTFTGYYMN
	938	CDRH2	AWINPNTGDTNYAQK
	991	CDRH3	ARVGDYYDRSGYYRHDAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1044	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAEDADYYCQAWDSSTGVFGGGTKVTVL
	1097	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1150	CDRL2	YGKNNRPS
	1203	CDRL3	QAWDSSTGV
<b>TC7-I-E11</b>	833	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRRPYWYFDLWGRG TLVTVSS
	886	CDRH1	GGSFSGYYWS
	939	CDRH2	GEINHSGSTNYNPS
	992	CDRH3	ARSRRPYWYFDL
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1045	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWY QQLPGTAPKLLIYGDSNRPSGVPDRFSGSGSGLTASLAI TGLQAEDEGDYQCQSFDSNLSRYVFGAGTKLTVL
	1098	CDRL1	TGSSSNIGAGYDVH
	1151	CDRL2	YGDSNRPS
	1204	CDRL3	QSFDSNLSRYV
<b>TC7-I-D07</b>	834	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSW IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVSRSGAFDIWGQGT MVTVSS
	887	CDRH1	GGSFSGYYWS
	940	CDRH2	GEINHSGSTNYNPS

	993	CDRH3	ARVSRSRGAFDI
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1046	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTNSDVGAYNYVSWY QQHPGKAPKLMIEVTNRPSGVSNRFSGSKSGNTASL TISGLQAEDEADYYCSSYTSSGTWVFGGGTKLTVL
	1099	CDRL1	TGTNSDVGAYNYVS
	1152	CDRL2	YEVTNRPS
	1205	CDRL3	SSYTSSGTWV
TC7- IV- H08	835	VH	QMQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSYDFWSGYPK DMDVWGKGTTVTVSS
	888	CDRH1	GFTFDDYAMH
	941	CDRH2	AVISYDGSNKYYADS
	994	CDRH3	ARSSYDFWSGYPKDMDV
	782	Линкер	GGSGGSGGSGGS
	1047	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQ KPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAEDADYYCNSRDSSGNHLVVFSGGGTKLTVL
	1100	CDRL1	QGDSLRSYYAS
	1153	CDRL2	YGKNNRPS
	1206	CDRL3	NSRDSSGNHLVV

Таблица 8. Таблица иллюстративных последовательностей scFv к CD70

Название	SEQ ID NO:	Последовательность
VH VL 15F8D9	1207	EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGVSWVRQAPG RGLEWVSGINWNGGSTAYADSVKGRFTISRDSA KNSLYLQMD SLRAEDTALYYCAREEGSYVWYFDIWGRGTLVTVSS <u>SGTSG</u> <u>SGKPGSGEGSTKGD</u> IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSQ SISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIASFILQSGVPSRFGGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYSNPFTFGPGTKVDIK
VL VH 15F8D9	1208	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSQ SISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIASFILQSGVPSRFGGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYSNPFTFGPGTKVDIK <u>GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLV</u>

		ESGGGVVVRPGGSLRLS CAASGFTFDDYGVSWVRQAPGRGLE WVSGINWNGGSTAYADSVKGRFTISRDS AKNSLYLQMDSLRA EDTALYYCAREEGSYVWYFDIWGRGTLVTVSS
<b>VH 15F8D9</b>	1248	EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLS CAASGFTFDDYGVSWVRQAPG RGLEWVSGINWNGGSTAYADSVKGRFTISRDS AKNSLYLQMD SLRAEDTALYYCAREEGSYVWYFDIWGRGTLVTVSS
<b>Линкер</b>	1237	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
<b>VH VL 15F8D9</b>	1249	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSQSISNYLNWYQQKPGKA PKVLIYASFILQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSNPFTFGPGTKVDIK
<b>VH VL 9A11E8</b>	1209	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSNYGMYWVRQAP GKGLEWVAVIWYDGSKKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDEDVMASFDYWGQGT LVTVSS <u>GST</u> <u>SGSGKPGSGEGSTKG</u> DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQD ISYLA WYQQKPGKAPQLLIY AASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPEDFATYSCQQLNSYPITFGGGTKVEIK
<b>VL VH 9A11E8</b>	1210	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQDISIYLA WYQQKPGKAP QLLIY AASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYSCQ QLNSYPITFGGGTKVEIK <u>GSTSGSGKPGSGEGSTKG</u> QVQLVE SGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSNYGMYWVRQAPGKGLEW VAVIWYDGSKKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDEDVMASFDYWGQGT LVTVSS
<b>VH 9A11E8</b>	1250	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSNYGMYWVRQAP GKGLEWVAVIWYDGSKKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDEDVMASFDYWGQGT LVTVSS
<b>Линкер</b>	1237	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
<b>VL 9A11E8</b>	1251	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQDISIYLA WYQQKPGKAP QLLIY AASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYSCQ QLNSYPITFGGGTKVEIK
<b>VH VL 9A1H6</b>	1211	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYMHWVRQAP GQGLEWMGWINPKSGGTSYAQQFQGRVTMTRDTS MSTVYM ELTRLRADDTAVYYCARLYSGWYGDYWGQGT LVTVSS <u>GST</u> <u>SGSGKPGSGEGSTKG</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DINNYLNWYQQKPGKVPNLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD

		FTFTISSLQPEDIATYYCQQYNNPPITFGQGTRLEIK
<b>VL VH 9A1H6</b>	1212	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDINNYLNWYQQKPGK VPNLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYY CQQYNNPPITFGQGTRLEIK <u>GSTSGSGKPGSGEGSTKG</u> QVQL VQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYMHVWRQAPGQGL EWMGWINPKSGGTSYAQQFQGRVTMTRDTSMSVYMELTRL RADDTAVYYCARLYYSGWYGDYWGQGLTVTVSS
<b>VH VL 4G7E8</b>	1213	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGLHWVRQAPG KGLDWVAVIWYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNMNTLFLQM NSLRAEDTAVYYCARDEAAAAGAFDIWGQGTMTVTVSS <u>GSTS</u> <u>GSGKPGSGEGSTKG</u> DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGI SSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYCQQLNYYISITFGQGTRLEIK
<b>VL VH 4G7E8</b>	1214	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAP KLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQ QLNYYISITFGQGTRLEIK <u>GSTSGSGKPGSGEGSTKG</u> QVQLVE SGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGLHWVRQAPGKGLDW VAVIWYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNMNTLFLQMNSLRAE DTAVYYCARDEAAAAGAFDIWGQGTMTVTVSS
<b>VH VL 2F1F7</b>	1215	EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYTMHWVRQAP GKGLEWVSLVSWDGGSTYYADSVKGRFTTSRDNSKKFLYLQ MNRLRTEDTALYFCAIDRAYRPYYYYHMDVWGKGTTVTVSS <u>GSTSGSGKPGSGEGSTKG</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQ ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLPIITFGQGTRLEIK
<b>VL VH 2F1F7</b>	1216	<u>G</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGK APKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYY CQQYDNLPIITFGQGTRLEIK <u>GSTSGSGKPGSGEGSTK</u> EVLV ESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYTMHWVRQAPGKGLE WVSLVSWDGGSTYYADSVKGRFTTSRDNSKKFLYLQMNRLR TEDTALYFCAIDRAYRPYYYYHMDVWGKGTTVTVSS
<b>VH VL 1E3D9</b>	1217	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASITSTSYWNWIRQPPG KGLEWIGRISYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSST ATDTAVYYCARQIRYNWNPDTFDIWGQGTMTVTVSS <u>GSTSGS</u> <u>GKPGSGEGSTKGE</u> IVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSLNS

		NLAWYQQKPAQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYDNWPLTFGGGKVEIK
<b>VL VH</b> <b>1E3D9</b>	1218	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSLNSNLAWYQQKPAQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYDNWPLTFGGGKVEIK <u>GSTSGSGKPGSGEGSTKG</u> QLQL QESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASITSTSYYWNWIRQPPGKGLE WIGRISYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTATDT AVYYCARQIRYNWNPDTFDIWGQGMVTVSS
<b>VH-</b> <b>линкер-</b> <b>VL1</b> <b>13C1G6</b>	1219	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSLISSSRFIYYADSVKGRFTVSRDNAKKSLEYLLNSL RAEDTAVYYCARGDYSNYPYFDYWGQGLVTVSS <u>GSTSGSG</u> <u>KPGSGEGSTKGE</u> IVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSS YLAWYQQKPGQPPRLLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYGDSPALTFGGGKVEIK
<b>VL1 VH</b> <b>13C1G6</b>	1220	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPGQ PPRLLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGDSPALTFGGGKVEIK <u>GSTSGSGKPGSGEGSTKGE</u> VQ LVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGL EWVSLISSSRFIYYADSVKGRFTVSRDNAKKSLEYLLNSLRAE DTAVYYCARGDYSNYPYFDYWGQGLVTVSS
<b>VH-</b> <b>линкер-</b> <b>VL2</b> <b>13C1G6</b>	1221	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSLISSSRFIYYADSVKGRFTVSRDNAKKSLEYLLNSL RAEDTAVYYCARGDYSNYPYFDYWGQGLVTVSS <u>GSTSGSG</u> <u>KPGSGEGSTKGE</u> DIQMTQSPNSLSASVGDRVTITCRASQSISW LAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFAGYYCQHYNTYSPTFGQGTKVEIK
<b>VL2 VH</b> <b>13C1G6</b>	1222	DIQMTQSPNSLSASVGDRVTITCRASQSISWYLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFAGYYC QHYNTYSPTFGQGTKVEIK <u>GSTSGSGKPGSGEGSTKGE</u> VQLV ESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSLISSSRFIYYADSVKGRFTVSRDNAKKSLEYLLNSLRAEDT AVYYCARGDYSNYPYFDYWGQGLVTVSS
<b>VH VL</b> <b>13G6E8</b>	1246	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSNYGIHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSYKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTALYYCARDTVDTYGSFDYWGQGLVTVSS <u>GSTS</u>

		<b><u>GSGKPGSGEGSTKG</u></b> DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITGRASQGI SSYLAWYQQKPGKAPNLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYCQQHNRYIPITFGQGTRLEIK
<b>VL VH</b> <b>13G6E8</b>	1247	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITGRASQGISSYLAWYQQKPGKAP NLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQ QHNRYIPITFGQGTRLEIK <b><u>GSTSGSGKPGSGEGSTKG</u></b> QVQLVE SGGGVVQP GKSLRLS CAASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSYKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TALYYCARDTVDTYGSFDYWGQGLVTVSS
<b>VH</b> <b>13G6E8</b>	1252	QVQLVESGGGVVQP GKSLRLS CAASGFTFSNYGIHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSYKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTALYYCARDTVDTYGSFDYWGQGLVTVSS
<b>Линкер</b>	1237	<b>GSTSGSGKPGSGEGSTKG</b>
<b>VL</b> <b>13G6E8</b>	1253	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITGRASQGISSYLAWYQQKPGKAP NLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQ QHNRYIPITFGQGTRLEIK
Домены VH показаны серым цветом. Домены VL показаны черным цветом. Линкеры выделены жирным шрифтом и подчеркнуты пунктирными линиями.		

Таблица 9. Таблица иллюстративных последовательностей sdAb к CD70

Название	SEQ ID NO:	Последовательность
Последовательности R2P16D9 70-001 к CD70 дикого типа	618	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCV A <b><u>GSIFSIARMNW</u></b> YRQAPGKQRELVAI <b><u>LN RAGRT</u></b> DYADSVKGRFTISSD NAKTTVY LQMNSLKPEDTALYYC <b><u>NLQ TISYHDF</u></b> WG QGTQVTVSS
R2P16D9 70-001 h7 к CD70	1224	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAAS <b><u>GSIFSIARMNW</u></b> Y RQAPGKQRELVAI <b><u>LN RAGRT</u></b> DYADSVKGRFTISSDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC <b><u>NLQ TISYHDF</u></b> WGQ GTQVTVSS
R2P16D9 70-001 h9 к CD70	1225	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAAS <b><u>GSIFSIARMNW</u></b> Y RQAPGKQRELVS <b><u>ILN RAGRT</u></b> DYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC <b><u>NLQ TISYHDF</u></b> WGQ GTQVTVSS
R2P16D9 70-001 h10 к CD70	1226	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAAS <b><u>GSIFSIARMNW</u></b> Y RQAPGKQRELVS <b><u>ILN RAGRT</u></b> YYADSVKGRFTISRDN

		AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC <u>NLQ</u> <u>TISYHDF</u> WGQ GTQVTVSS
R2P16D9 70- 001 h11 к CD70	1227	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GSIFSIAR</u> MSWY RQAPGKQRELVS <u>ILNRAGRT</u> YYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC <u>NLQ</u> <u>TISYHDF</u> WGQ GTQVTVSS
CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.		

Таблица 10. Таблица иллюстративных последовательностей PD-1

Название	SEQ ID NO:	Последовательность
Слитый белок PD1CD28/рецептор- переключатель, аминокислотная последовательность	1239	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWN PPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYR MSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGR DFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLR AELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQTLVVGVV GGLLGSLLVWVLA VIRSKRSLLHSDYMNMT RRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
Слитый белок PD1CD28/рецептор- переключатель, аминокислотная последовательность без сигнального пептида	1244	PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSF SNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQ DCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGA ISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPPRP AGQFQTLVVGVVGGLLGSLLVWVLA VIRSKRS RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RS
Сигнальный пептид PD-1	1256	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWR
N-петля PD-1	1257	PGWFLDSPDRPWN
IgV PD-1	1258	PTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYR MSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGR DFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLR AELRVT
Стеблевая область PD-1	1259	ERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQTLV
Трансмембранный домен PD-1	1263	VGVVGGLLGSLLVWVLA VI

IC CD28	1260	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRD FAAYRS
---------	------	---

Таблица 11. Таблица иллюстративных последовательностей IL-15 или IL-15R

Название	SEQ ID NO:	Последовательность
IL-15 без сигнального пептида	1242	GIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQS MHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEE LEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
Последовательность белка IL-15	1245	MRISKPHLRSISIQCYLCLLNHFLTEAGIHVFILGC FSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY TESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEF LQSFVHIVQMFINTS
Сигнальный пептид IL-15	1246	MRISKPHLRSISIQCYLCLLNHFLTEA
Последовательность полноразмерного белка IL-15R $\alpha$	1247	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPP MSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSS LTECVLNKATNV AHWTTPSLKCIRD PALVHQR PAP PSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATT AAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTA KNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLL CGLSAVSL LACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVT WGTSSRDEDLENC SHHL
Внутриклеточный домен IL-15R $\alpha$	1248	KSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENC SHHL
Растворимый IL-15R $\alpha$ (sIL-15R $\alpha$ )	1249	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRK AGTSSLTECVLNKATNV AHWTTPSLKCIRD PALVH QR PAPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNN TAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTP SQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTT
Домен Sushi IL-15	1250	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRK AGTSSLTECVLNKATNV AHWTTPSLKCIR
Область IL-15R $\alpha$ , расположенная по	1251	DPALVHQR PAPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAA SSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSH

ходу транскрипции домена Sushi		ESSHGTSPQTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSD TTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASV EMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL
Трансмембранный домен IL-15R $\alpha$	1252	VAISTSTVLLCGLSAVSLACYL
Слитый белок IL-15- IL15R $\alpha$	1253	GIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQS MHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEE LEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSEHADIWVKSYSL YSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLS PSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPS TGTTEISSHESHGTSPQTAKNWELTASASHQPPG VYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSR QTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSH HL
Слитый белок PD-1- CD28-IL-15R $\alpha$	1254	PGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVVTEGDNATFTCSF SNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQ DCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYCGA ISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPPRP AGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLA VIRSKRS RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RSKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLE NCSHHL
Слитый белок PD-1- CD28-IL-15R $\alpha$ с сигнальным пептидом PD-1	1262	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWN PPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYR MSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGR DFHMSVVRARRNDSGTLYCGAISLAPKAQIKESLR AELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQTLVVGVV GGLLGSLVLLVWVLA VIRSKRSRLLHSDYMNMT RRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKSRQTPPLASV EMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL

Таблица 12. Таблица иллюстративных конструкций последовательностей

Констру	SEQ	Компонент	Последовательность
---------	-----	-----------	--------------------

кция	ID NO:		
TFP 70-001	1233	Полная последовательность	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVQLQESGGGLVQ PGGSLRLSCVASGSIFSARMNWYRQAPGKQREL VAILNRAGRTDYADSVKGRFTISSDNAKTTVYLQ MNSLKPEDTALYYCNLQTISYHDFWGQGTQVTV SSAAAGGGGSGGGGSGGGGSLEDGNEEMGGITQ TPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGG DEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGS KPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIV DICITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAG GRQRGQNKERPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLN QRRI
	1234	Сигнальный пептид GM-CSFR $\alpha$	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP
	618	70-001	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIFSARMN WYRQAPGKQRELVAILNRAGRTDYADSVKGRFTI SSDNAKTTVYLMNSLKPEDTALYYCNLQTISYH DFWGQGTQVTVSS
	692	Линкер	AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE
	1235	CD3e	DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEIL WQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQ SGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEM DVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKA KPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDYEPIRK GQRDLYSGLNQRRI
TFP C10	1236	Полная последовательность	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQSALTQPRSVSGSP GQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKL MIYDVTNRPSGVPDRFSASKSDNTATLTVSGVQA EDEADYYCSSYAGSHELFGGGTKLTVLGSTSGSG KPGSGEGSTKGEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDS DTRYSPSFQGVTVISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCAISRTEYVMDVWGQGTTVTVSSAAAGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSLEDGNEEMGGITQTPYKVSIS

			GTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIG SDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANF YLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGL LLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQN KERPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRRI
	1234	Сигнальный пептид GM-CSFRa	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP
	1012	vL C10	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYV SWYQQHPGKAPKLMYDVTNRPSGVPDRFSASKS DNTATLTVSGVQAEDEADYYCSSYAGSHELFGG GTKLTVL
	1237	Линкер	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
	800	vH C10	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIG WVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCAISRTES YVMDVWGQGT TTVTVSS
	692	Линкер	AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE
	1235	CD3e	DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEIL WQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQ SGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEM DVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKA KPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDYEPIRK GQRDLYSGLNQRRRI
TFP C10+PD 1-CD28	1264	Полная последовательность	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQSALTQPRSVSGSP GQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKL MIYDVTNRPSGVPDRFSASKSDNTATLTVSGVQA EDEADYYCSSYAGSHELFGGGTKLTVLGSTSGSG KPGSGEGSTKGEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYCAISRTESYVMDVWGQGT TTVTVSSAAAGG GGSGGGGSGGGGSLEDGNEEMGGITQTPYKVSIS GTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIG

		SDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANF YLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGL LLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQN KERPPVPNPDYEPIRKQQRDLYSGLNQRRIGSGE GRGSLTTCGDVEENPGPGMQIPQAPWPVWAVL QLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVVTEGDN ATFTCSFSNTSEFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFE DRSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRND SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRA EVP TAHPSPSPRAGQFQTLVVGVVGGLLGSLLVLLVW VLAVIRSKRSLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP YAPPRDFAAYRS
1234	Сигнальный пептид GM- CSFRa	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP
1012	vL C10	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYV SWYQQHPGKAPKLMYDVTNRPSGVPDRFSASKS DNTATLTVSGVQAEDAEDYCYSSYAGSHELFGG GTKLTVL
1237	Линкер	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
800	vH C10	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIG WVRQMPGKGLEWMGIYPGDS DTRYSPSFQQQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCAISRTES YVMDVWGQGTITVTVSS
692	Линкер	AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE
1235	CD3e	DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEIL WQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQ SGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEM DVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKA KPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDYEPIRK QQRDLYSGLNQRRRI
1238	T2A	GSGEGRGSLTTCGDVEENPGPG
1239	Слитый белок PD-1	MQIPQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPW NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSEFVLNW

		CD28	YRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRVTQLP NGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIK ESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVIRSKRSLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
TFP C10+IL1 5-IL15Ra	1240	Полная последова- тельность	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQSALTQPRSVSGSP GQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKL MIYDVTNRPSGVPDRFSASKSDNTATLTVSGVQA EDEADYYCSSYAGSHELFGGGTKLTVLGSTSGSG KPGSGEGSTKGEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVTVISADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYYCAISRTEYVMDVWGQGTTVTVSSAAAGG GGSGGGGSGGGGSLEDGNEEMGGITQTPYKVSIS GTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIG SDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANF YLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGL LLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQN KERPPPVPNPDIYEPYPIRKGQRDLYSGLNQRRISSGE GRGSLTTCGDVEENPGPMRISKPHLRSISIQCYLCL LLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLLELQVISLESGDASIHTVENLIILANNSLSSNG NVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITCPPPMS VEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLT ECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAAP STVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATT AAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQT AKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTV LLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEAL PVTWGTSSRDEDELENCSHHL
	1234	Сигнальный пептид CGM-	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP

	CSFRa	
1012	VL C10	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYV SWYQQHPGKAPKLMYDVTNRPSGVPDRFSASKS DNTATLTVSGVQAEDEADYYCSSYAGSHELFGG GTKLTVL
1237	Линкер	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
800	VH C10	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIG WVRQMPGKGLEWMGIYPGDSDRYSPSFQQQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCAISRTES YVMDVWGQGTTVTVSS
692	Линкер	AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE
1235	CD3e	DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEIL WQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQ SGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEM DVMSVATIVIDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKA KPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPYR GQRDLYSGLNQRRI
1238	T2A	GSGEGRGSLTCDGVEENPGP
1241	Слитый белок IL15- IL15Ra	MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILG CFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT LYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASI HDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEK NIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGSLQITCPPMSVEHADIWVKSYSLYS RERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWT TPSLKCIDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLS PSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPS TGTTEISSHESHGTPSQTAKNWELTASASHQPP GVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLK SRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENC SHHL

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), отличающаяся тем, что TFP содержит:

(a) субъединицу TCR, содержащую:

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и

(ii) трансмембранный домен TCR,

(iii) внутриклеточный домен TCR и

(b) антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD70; и

где субъединица TCR и антигенсвязывающий домен функционально связаны.

2. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1, отличающаяся тем, что TFP функционально взаимодействует с эндогенным комплексом TCR при экспрессии в Т-клетке.

3. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что внутриклеточный домен TCR содержит стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3-гамма, CD3-дельта или CD3-эпсилон.

4. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что Т-клетка, экспрессирующая TFP, проявляет повышенную цитотоксичность по отношению к клетке человека, экспрессирующей CD70, по сравнению с Т-клеткой, не содержащей TFP.

5. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности.

6. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 5, отличающаяся тем, что длина линкера составляет 120 аминокислот или менее.

7. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 5, отличающаяся тем, что линкерная последовательность содержит  $(G_4S)_n$ , где G представляет собой глицин, S представляет собой серин, а n представляет собой целое число от 1 до 10.

8. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 7, отличающаяся тем, что n представляет собой целое число от 1 до 4.

9. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из одной и той же субъединицы TCR.

10. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из TCR-альфа.

11. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из TCR-бета.

12. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из TCR-гамма.

13. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из TCR-дельта.

14. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из CD3-эпсилон.

15. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из CD3-дельта.

16. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из CD3-гамма.

17. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-16, отличающаяся тем, что все три из внеклеточного домена TCR, трансмембранного домена TCR и внутриклеточного домена TCR получены из одной и той же субъединицы TCR.

18. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 17, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR получены из CD3-эпсилон.

19. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 17, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR получены из CD3-дельта.

20. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 17, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR получены из CD3-гамма.

21. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 17, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR содержат константный домен TCR-альфа.

22. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 21, отличающаяся тем, что константный домен TCR-альфа является мышинным.

23. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 17, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR содержат константный домен TCR-бета.

24. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 23, отличающаяся тем, что константный домен TCR-бета является мышинным.

25. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 17, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR содержат константный домен TCR-гамма.

26. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 17, отличающаяся тем, что внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и внутриклеточный домен TCR содержат константный домен TCR-дельта.

27. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-26, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой верблюжье антитело или его связывающий фрагмент.

28. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-26, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой мышиное антитело или его связывающий фрагмент.

29. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-26, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой человеческое или гуманизированное антитело или его связывающий фрагмент.

30. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-29, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) или однодоменное антитело (sdAb).

31. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-30, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело (sdAb).

32. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 31, отличающаяся тем, что sdAb представляет собой  $V_{HH}$ .

33. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-32, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен связывается с CD70 человека со значением  $K_D$  100 нМ или менее или от около 0,001 нМ до около 100 нМ.

34. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-33, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен не конкурирует с CD27 за связывание с CD70, не ингибирует взаимодействие CD70 с CD27 и/или не связывается с тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27.

35. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-33, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен конкурирует с CD27 за связывание с CD70, ингибирует взаимодействие CD70 с CD27 и/или связывается с тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27.

36. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-33, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен специфически связывается с эпитопом, который находится в аминокислотной последовательности HRDGIYMVNIQVTLAICSSTAS (SEQ ID NO:1230).

37. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 36, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен содержит scFv, имеющий по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1207-1222, 1246 и 1247.

38. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 36, отличающаяся тем,

что антигенсвязывающий домен содержит домен sdAb, имеющий по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1223-1227.

39. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-35, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен содержит переменный домен, содержащий определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3.

40. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-35 и 39, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен содержит переменный домен, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 603-620 и 622-688.

41. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-35 и 39, отличающаяся тем, что

(i) CDR1 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 87-104 и 107-172;

(ii) CDR2 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 259-276 и 279-344; и

(iii) CDR3 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 431-448 и 451-516.

42. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-35 и 39, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен содержит переменный домен, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 618.

43. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 42, отличающаяся тем, что переменный домен имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 618.

44. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 43, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 618.

45. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 42-44, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 102, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 274 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 446.

46. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 42, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен содержит домен sdAb, имеющий по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1224-1227.

47. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-30, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

48. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835.

49. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835.

50. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем,

что scFv содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 783-835.

51. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47-50, отличающаяся тем, что scFv содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047.

52. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47-50, отличающаяся тем, что scFv содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047.

53. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47-50, отличающаяся тем, что scFv содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 995-1047.

54. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 48-53, отличающаяся тем, что домен VH содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDRH1), имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 836-888, CDRH2, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 889-941, и CDRH3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 942-994.

55. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 48-54, отличающаяся тем, что домен VL содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDRL1), имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1048-1100, CDRL2, имеющую последовательность любую из SEQ ID NO: 1101-1153, и CDRL3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1154-1206.

56. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1248.

57. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248.

58. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47, 56, и 57, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1249.

59. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47, 56 и 57, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249.

60. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1248, и домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1249.

61. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248 и домен VL с

последовательностью SEQ ID NO: 1249.

62. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 61, отличающаяся тем, что домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249.

63. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 61, отличающаяся тем, что домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248.

64. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 56-63, отличающаяся тем, что scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

65. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 62 или п. 63, отличающаяся тем, что VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249 функционально связаны через линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

66. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 56-65, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1207 или SEQ ID NO: 1208.

67. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 56-65, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность SEQ ID NO: 1207 или SEQ ID NO: 1208.

68. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1250.

69. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250.

70. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47, 68, и 69, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1251.

71. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47, 68 и 69, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251.

72. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1250, и домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1251.

73. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251.

74. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 73, отличающаяся тем, что домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251.

75. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 73, отличающаяся тем, что домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250.

76. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 68-75, отличающаяся тем, что scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

77. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 74 или п. 75, отличающаяся тем, что VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251 функционально связаны через линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

78. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 68-77, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1209 или SEQ ID NO: 1210.

79. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 68-77, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность SEQ ID NO: 1209 или SEQ ID NO: 1210.

80. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1252.

81. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252.

82. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47, 80, и 81, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1253.

83. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47, 80 и 81, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253.

84. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1252, и домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1253.

85. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 47, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253.

86. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 85, отличающаяся тем, что домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253.

87. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 85, отличающаяся тем, что домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252.

88. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 80-87,

отличающаяся тем, что scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

89. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 86 или п. 87, отличающаяся тем, что VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253 функционально связаны через линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

90. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 80-89, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1246 или SEQ ID NO: 1247.

91. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 79-88, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность SEQ ID NO: 1246 или SEQ ID NO: 1247.

92. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47-91, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен специфически связывается со вторым эпитопом, который находится в аминокислотной последовательности ASRHHPTTLAVGICSPARSISL (SEQ ID NO:1231).

93. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 92, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, который содержит CDRH1 с SEQ ID NO: 853, CDRH2 с SEQ ID NO: 906 и CDRH3 с SEQ ID NO: 959, и домен VL, который содержит CDRL1 с SEQ ID NO: 1065, CDRL2 с SEQ ID NO: 1118 и CDRL3 с SEQ ID NO: 1171.

94. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47-93, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800.

95. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47-93, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 800.

96. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47-93, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012.

97. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47-93, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1012.

98. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47-93, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800, и домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012.

99. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47-93, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 800 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1012.

100. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 47-99, отличающаяся тем, что scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 782.

101. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-100,

отличающаяся тем, что Т-клетка, экспрессирующая TFP, ингибирует рост опухоли при экспрессии в Т-клетке.

102. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-100, отличающаяся тем, что Т-клетка, экспрессирующая TFP, имеет повышенный фратрицид по сравнению с TFP, имеющим другой антигенсвязывающий домен.

103. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-100, отличающаяся тем, что Т-клетка, экспрессирующая TFP, имеет пониженный уровень фратрицид по сравнению с TFP, имеющим другой антигенсвязывающий домен.

104. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1, отличающаяся тем, что молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты кодирует любую из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 1233, 1236, 1240 и 1264.

105. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность, кодирующую антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с CD70.

106. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 105, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой верблюжье антитело или его связывающий фрагмент.

107. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 105, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой мышинное, человеческое или гуманизированное антитело или его связывающий фрагмент.

108. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 105-107, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или однодоменное антитело (sdAb).

109. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 108, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой однодоменное антитело (sdAb).

110. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 109, отличающаяся тем, что sdAb представляет собой  $V_{HH}$ .

111. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 105-110, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела связывается с CD70 человека со значением  $K_D$  100 нМ или менее или от около 0,001 нМ до около 100 нМ.

112. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 105-111, отличающаяся тем, что указанное антитело или фрагмент антитела не конкурирует с CD27 за связывание с CD70, не ингибирует взаимодействие CD70 с CD27 и/или не связывается с одним и тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27.

113. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 105-111, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела конкурирует с CD27 за связывание с CD70, ингибирует взаимодействие CD70 с CD27 и/или связывается с тем же эпитопом CD70, с которым связывается CD27.

114. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 105-111,

отличающаяся тем, что антигенсвязывающий домен специфически связывается с эпитопом, который находится в аминокислотной последовательности HRDGIYMVNIQVTLAICSSTTAS (SEQ ID NO:1230).

115. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 114, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела содержит scFv, имеющий по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1207-1222, 1246, и 1247.

116. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 114, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела содержит домен sdAb, имеющий по меньшей мере около 90% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1223-1227.

117. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 105-113, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела содержат переменный домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3.

118. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 105-113 и 117, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела содержат переменный домен, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 603-620 и 622-688.

119. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 105-113 и 117, отличающаяся тем, что

- (i) CDR1 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 87-104 и 107-172;
- (ii) CDR2 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 259-276 и 279-344; и
- (iii) CDR3 содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 431-448 и 451-516.

120. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 105-113 и 117, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела содержит переменный домен, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 618.

121. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 120, отличающаяся тем, что переменный домен имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 618.

122. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 121, отличающаяся тем, что переменный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 618.

123. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 120-122, отличающаяся тем, что CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 102, CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 274 и CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 446.

124. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 120, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела содержит домен sdAb, имеющий по меньшей мере около 80% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1224-1227.

125. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 105-108,

отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой scFv.

126. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835.

127. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 783-835.

128. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 783-835.

129. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125-128, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047.

130. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125-128, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 995-1047.

131. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125-128, отличающаяся тем, что scFv содержит переменный домен легкой цепи (VL), имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 995-1047.

132. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 126-131, отличающаяся тем, что домен VH содержит CDRH1, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 836-888, CDRH2, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 889-941, и CDRH3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 942-994.

133. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 126-132, отличающаяся тем, что домен VL содержит CDRL1, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1048-1100, CDRL2, имеющую последовательность любую из SEQ ID NO: 1101-1153, и CDRL3, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1154-1206.

134. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1248.

135. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248.

136. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125, 134, и 135, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1249.

137. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125, 134 и 135, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249.

138. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1248, и домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1249.

139. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249.

140. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 139, отличающаяся тем, что домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249.

141. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 139, отличающаяся тем, что домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248.

142. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 134-141, отличающаяся тем, что scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

143. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 140 или п. 141, отличающаяся тем, что VH с последовательностью SEQ ID NO: 1248 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1249 функционально связаны через линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

144. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 134-143, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1207 или SEQ ID NO: 1208.

145. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 134-143, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность SEQ ID NO: 1207 или SEQ ID NO: 1208.

146. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1250.

147. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250.

148. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125, 146, и 147, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1251.

149. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125, 146 и 147, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251.

150. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1250, и домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1251.

151. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251.

152. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 151, отличающаяся тем, что домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251.

153. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 151, отличающаяся тем, что домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250.

154. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 146-153, отличающаяся тем, что scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

155. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 152 или п. 153, отличающаяся тем, что VH с последовательностью SEQ ID NO: 1250 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1251 функционально связаны через линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

156. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 68-155, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1209 или SEQ ID NO: 1210.

157. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 68-155, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность SEQ ID NO: 1209 или SEQ ID NO: 1210.

158. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1252.

159. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252.

160. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125, 158, и 159, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1253.

161. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125, 158 и 159, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253.

162. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1252, и домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1253.

163. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 125, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253.

164. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 163, отличающаяся

тем, что домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253.

165. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 163, отличающаяся тем, что домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253 функционально связан через свой С-конец с N-концом домена VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252.

166. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 158-165, отличающаяся тем, что scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

167. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 164 или п. 165, отличающаяся тем, что VH с последовательностью SEQ ID NO: 1252 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 1253 функционально связаны через линкерную последовательность SEQ ID NO: 1237.

168. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 158-167, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1246 или SEQ ID NO: 1247.

169. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 158-167, отличающаяся тем, что scFv содержит последовательность SEQ ID NO: 1246 или SEQ ID NO: 1247.

170. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 119-169, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела специфически связывается со вторым эпитопом, который находится в аминокислотной последовательности ASRHHPTTLAVGICSPARSISL (SEQ ID NO:1231).

171. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125-168, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, который содержит CDRH1 с SEQ ID NO: 853, CDRH2 с SEQ ID NO: 906 и CDRH3 с SEQ ID NO: 959, и домен VL, который содержит CDRL1 с SEQ ID NO: 1065, CDRL2 с SEQ ID NO: 1118 и CDRL3 с SEQ ID NO: 1171.

172. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125-168, и 171, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800.

173. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125-168, и 171, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012.

174. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125-168, 171, отличающаяся тем, что scFv содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 800, и домен VL, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1012.

175. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 125-174, отличающаяся тем, что scFv содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 782.

176. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 105-175, отличающаяся тем, что молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты дополнительно

содержит последовательность, кодирующую константный домен TCR.

177. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 176, отличающаяся тем, что антитело или фрагмент антитела функционально связаны с последовательностью, кодирующей константный домен TCR, тем самым образуя TFP.

178. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 176 или п. 177, отличающаяся тем, что константный домен TCR представляет собой константный домен TCR-альфа или его часть, константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-альфа или его часть и константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-гамма или его часть, константный домен TCR-дельта или его часть или константный домен TCR-гамма или его часть и константный домен TCR-дельта или его часть.

179. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 105-178, дополнительно содержащая лидерную последовательность.

180. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-179, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из ДНК и РНК.

181. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 180, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой мРНК.

182. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 180, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой кРНК.

183. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-182, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота содержит нуклеотидный аналог.

184. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 183, отличающаяся тем, что нуклеотидный аналог выбран из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропила, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор, 2'-О-аминопропила (2'-О-АР), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-DMAEOE), модифицированного 2'-О-N-метилацетамида (2'-О-NMA), закрытой нуклеиновой кислоты (ЗНК), этиленнуклеиновой кислоты (ЭНК), пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК), 1',5'-ангидрогекситоловой нуклеиновой кислоты (АНК), морфолино, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор N3-P5'-фосфорамидита.

185. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-184, дополнительно содержащая промотор.

186. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-185, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой транскрибируемую *in vitro* нуклеиновую кислоту.

187. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-186, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую поли(А)-хвост.

188. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-187,

отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность 3'UTR.

189. Полипептид, кодируемый молекулой рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-188.

190. Вектор, содержащий молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-104, 177, 178, и 179.

191. Вектор, содержащий молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по пп. 105-176.

192. Вектор по п. 190, дополнительно содержащий последовательность, кодирующую кнРНК, кшРНК или миРНК для снижения эндогенных уровней CD70.

193. Вектор по п. 190, дополнительно содержащий последовательность, кодирующую ингибирующую молекулу, содержащую первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанную со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.

194. Вектор по п. 190, дополнительно содержащий последовательность, кодирующую константный домен TCR.

195. Вектор по п. 194, отличающаяся тем, что константный домен TCR представляет собой константный домен TCR-альфа или его часть, константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-альфа или его часть и константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-гамма или его часть, константный домен TCR-дельта или его часть или константный домен TCR-гамма или его часть и константный домен TCR-дельта или его часть.

196. Вектор по любому из пп. 190-195, отличающийся тем, что вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, вектора на основе вируса саркомы Рауса (RSV) или ретровирусного вектора.

197. Вектор по любому из пп. 190-196, дополнительно содержащий промотор.

198. Вектор по любому из пп. 190-197, отличающийся тем, что вектор представляет собой вектор, транскрибируемый *in vitro*.

199. Вектор по любому из пп. 190-198, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит поли(A)-хвост.

200. Вектор по любому из пп. 190-199, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3'UTR.

201. Клетка, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-188, полипептид по п. 189 или вектор по любому из пп. 190-200.

202. Клетка, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), где TFP содержит:

(а) субъединицу TCR, содержащую:

(i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и

(ii) трансмембранный домен TCR,

- (iii) внутриклеточный домен TCR и
- (b) антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD70; и где субъединица TCR и антигенсвязывающий домен функционально связаны.

203. Клетка по п. 201 или п. 202, отличающаяся тем, что клетка представляет собой Т-клетку.

204. Клетка по п. 203, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой Т-клетку человека.

205. Клетка по п. 203 или п. 204, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Т-клетку.

206. Клетка по п. 203, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой человеческую  $\alpha\beta$ -Т-клетку.

207. Клетка по п. 203, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой  $\gamma\delta$ -Т-клетку человека.

208. Клетка по любому из пп. 201 или 202, отличающаяся тем, что клетка представляет собой НКТ-клетку человека.

209. Т-клетка, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-175, полипептид по п. 176 или вектор по любому из пп. 177-187.

210. Т-клетка, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, кодирующую слитый белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), где TFP содержит:

- (a) субъединицу TCR, содержащую:
  - (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и
  - (ii) трансмембранный домен TCR,
  - (iii) внутриклеточный домен TCR и
- (b) антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD70; и где субъединица TCR и антигенсвязывающий домен функционально связаны.

211. Т-клетка по п. 209 или п. 210, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой Т-клетку человека.

212. Т-клетка по п. 209 или п. 210, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Т-клетку.

213. Т-клетка по п. 209 или п. 210, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой человеческую  $\alpha\beta$ -Т-клетку.

214. Т-клетка по п. 209 или п. 210, отличающаяся тем, что Т-клетка представляет собой  $\gamma\delta$ -Т-клетку человека.

215. Клетка по п. 201 или 202 или Т-клетка по п. 209 или 210, дополнительно содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, связанную со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.

216. Клетка или Т-клетка по п. 215, отличающаяся тем, что ингибирующая

молекула содержит первый полипептид, содержащий по меньшей мере часть PD-1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

217. Клетка или Т-клетка по п. 216, отличающаяся тем, что ингибирующая молекула содержит последовательность SEQ ID NO: 1239 или SEQ ID NO: 1244.

218. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 215-217, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая TFP, и нуклеиновая кислота, кодирующая ингибирующую молекулу, включены в одну молекулу нуклеиновой кислоты.

219. Клетка или Т-клетка по пп. 215-217, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая TFP, и нуклеиновая кислота, кодирующая ингибирующую молекулу, включены в две отдельные молекулы нуклеиновой кислоты.

220. Клетка по п. 201 или 202 или Т-клетка по п. 209 или 210, отличающаяся тем, что эта клетка или Т-клетка дополнительно содержит вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент.

221. Клетка или Т-клетка по п. 220, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая TFP, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в одну молекулу нуклеиновой кислоты.

222. Клетка или Т-клетка по п. 220, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая TFP, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в две отдельные молекулы нуклеиновой кислоты.

223. Клетка или Т-клетка по п. 221, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая TFP, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связаны вторым линкером.

224. Клетка или Т-клетка по п. 223, отличающаяся тем, что второй линкер содержит сайт расщепления протеазой.

225. Клетка или Т-клетка по п. 224, отличающаяся тем, что сайт расщепления протеазой представляет собой сайт расщепления 2A.

226. Клетка или Т-клетка по п. 225, отличающаяся тем, что сайт расщепления 2A представляет собой сайт расщепления T2A.

227. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 220-226, отличающаяся тем, что экспрессия IL-15 увеличивает стойкость клеток.

228. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 220-227, отличающаяся тем, что полипептид IL-15 секретируется при экспрессии в клетке или Т-клетке.

229. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 220-228, отличающаяся тем, что полипептид IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 1242.

230. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 220-229, отличающаяся тем, что вторая последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно кодирует субъединицу рецептора IL-15 (IL-15R) или ее фрагмент.

231. Клетка или Т-клетка по п. 230, отличающаяся тем, что субъединица IL-15R

представляет собой IL-15R-альфа (IL-15R $\alpha$ ).

232. Клетка или Т-клетка по п. 231, отличающаяся тем, что IL-15 и IL-15R $\alpha$  функционально связаны третьим линкером.

233. Клетка по п. 232, отличающаяся тем, что третий линкер не является расщепляемым линкером.

234. Клетка или Т-клетка по п. 233, отличающаяся тем, что третий линкер содержит последовательность, содержащую (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, где G представляет собой глицин, S представляет собой серин, а n представляет собой целое число от 1 до 10.

235. Клетка или Т-клетка по п. 234, отличающаяся тем, что n представляет собой целое число от 1 до 4.

236. Клетка или Т-клетка по п. 235, отличающаяся тем, что n равно 3.

237. Клетка или Т-клетка по п. 236, отличающаяся тем, что третий линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 1243.

238. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 230-237, отличающаяся тем, что вторая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует слитый белок, содержащий полипептид IL-15, связанный с субъединицей IL-15R $\alpha$ .

239. Клетка или Т-клетка по п. 238, отличающаяся тем, что полипептид IL-15 связан с N-концом субъединицы IL-15R $\alpha$ .

240. Клетка или Т-клетка по п. 238, отличающаяся тем, что слитый белок содержит аминокислоты 30-162 IL-15.

241. Клетка или Т-клетка по п. 238, отличающаяся тем, что слитый белок содержит аминокислоты 31-267 IL-15R $\alpha$ .

242. Клетка или Т-клетка по п. 238, отличающаяся тем, что слитый белок дополнительно содержит домен Sushi.

243. Клетка или Т-клетка по п. 238, отличающаяся тем, что слитый белок содержит последовательность SEQ ID NO: 1244.

244. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 238-243, отличающаяся тем, что слитый белок экспрессируется на клеточной поверхности при экспрессии в клетке или Т-клетке.

245. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 238-243, отличающаяся тем, что слитый белок секретируется при экспрессии в клетке или Т-клетке.

246. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 220-245, отличающаяся тем, что клетка или Т-клетка дополнительно содержит третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PD-1.

247. Клетка или Т-клетка по п. 246, отличающаяся тем, что полипептид PD-1 функционально связан через свой С-конец с N-концом внутриклеточного домена костимулирующего полипептида.

248. Клетка или Т-клетка по п. 246 или п. 247, отличающаяся тем, что третья последовательность нуклеиновой кислоты включена в ту же молекулу нуклеиновой кислоты, что и первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты.

249. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 247 или 248, отличающиеся тем, что

полипептид PD-1 связан с внутриклеточным доменом костимулирующего полипептида через трансмембранный домен PD-1.

250. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 247-249, отличающаяся тем, что костимулирующий полипептид выбран из группы, включающей OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD28, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, CD226, FcγRI, FcγRII и FcγRIII.

251. Клетка или Т-клетка по п. 247, отличающаяся тем, что внутриклеточный домен костимулирующего полипептида содержит по меньшей мере часть CD28.

252. Клетка или Т-клетка по п. 247, отличающаяся тем, что внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1 связаны с внутриклеточным доменом CD28.

253. Клетка или Т-клетка по п. 246, отличающаяся тем, что клетка или Т-клетка содержит слитый белок, содержащий внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1, связанный с внутриклеточным доменом CD28, связанным с IL-15Rα.

254. Клетка или Т-клетка по п. 253, отличающаяся тем, что слитый белок содержит последовательность SEQ ID NO: 1254 или SEQ ID NO: 1262.

255. Клетка по п. 201 или 202 или Т-клетка по п. 209 или 210, отличающаяся тем, что клетка или Т-клетка дополнительно содержит вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид альфа-рецептора интерлейкина-15 (IL-15Rα) или его фрагмент.

256. Клетка или Т-клетка по п. 255, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая TFR, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в одну молекулу нуклеиновой кислоты.

257. Клетка или Т-клетка по п. 255, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая TFR, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты включены в две отдельные молекулы нуклеиновой кислоты.

258. Клетка или Т-клетка по п. 256, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая TFR, и вторая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связаны вторым линкером.

259. Клетка или Т-клетка по п. 258, отличающаяся тем, что второй линкер содержит сайт расщепления протеазой.

260. Клетка или Т-клетка по п. 259, отличающаяся тем, что сайт расщепления протеазой представляет собой сайт расщепления 2A.

261. Клетка или Т-клетка по п. 260, отличающаяся тем, что сайт расщепления 2A представляет собой сайт расщепления T2A.

262. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 255-261, отличающаяся тем, что вторая последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно кодирует PD-1 или его фрагмент.

263. Клетка или Т-клетка по п. 262, отличающаяся тем, что вторая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует внеклеточный домен PD-1.

264. Клетка или Т-клетка по п. 262 или п. 263, отличающиеся тем, что вторая

последовательность нуклеиновой кислоты кодирует внеклеточный и трансмембранный домен PD-1.

265. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 262-264, отличающаяся тем, что вторая последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно кодирует CD28 или его фрагмент.

266. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 262-265, отличающаяся тем, что вторая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует внутриклеточный домен CD28.

267. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 262-266, отличающаяся тем, что вторая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует слитый белок, содержащий внеклеточный домен и трансмембранный домен PD-1, связанный с внутриклеточным доменом CD28, связанным с IL-15R $\alpha$ .

268. Клетка или Т-клетка по п. 267, отличающиеся тем, что внутриклеточный домен CD28 связан с внутриклеточным доменом IL-15R $\alpha$ .

269. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 262-268, отличающиеся тем, что вторая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность SEQ ID NO: 1245.

270. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 255-269, отличающиеся тем, что молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты дополнительно содержит третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид интерлейкина-15 (IL-15) или его фрагмент.

271. Клетка или Т-клетка по п. 270, отличающиеся тем, что полипептид IL-15 или его фрагмент секретируется при экспрессии в клетке или Т-клетке.

272. Клетка или Т-клетка по п. 271, отличающиеся тем, что клетка или Т-клетка секретирует полипептид IL-15 в ответ на агент активации Т-клетки.

273. Клетка или Т-клетка по п. 220, отличающиеся тем, что сигналинг IL-15 усиливается в ответ на агент активации Т-клеток.

274. Клетка или Т-клетка по п. 273, отличающиеся тем, что агент активации Т-клетки содержит антитело к CD3 или его фрагмент, антитело к CD28 или его фрагмент, цитокин, антиген, который связывает антигенсвязывающий домен TFP, или любые их комбинации.

275. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 201-274, отличающиеся тем, что TFP функционально взаимодействует с эндогенным комплексом TCR при экспрессии в Т-клетке.

276. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 201-274, отличающиеся тем, что клетка или Т-клетка имеет функциональное нарушение эндогенного TCR.

277. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 201-276, отличающиеся тем, что клетка или Т-клетка представляет собой аллогенную клетку или Т-клетку.

278. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 201-277, отличающиеся тем, что клетка или Т-клетка имеет функциональное нарушение эндогенного гена CD70.

279. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 201-277, отличающиеся тем, что клетка

или Т-клетка имеет функциональное нарушение эндогенного гена СПТА.

280. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 201-277, отличающиеся тем, что клетка или Т-клетка дополнительно содержит антисмысловую кРНК, кшРНК или миРНК для снижения эндогенных уровней CD70.

281. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 201-277, отличающиеся тем, что клетка или Т-клетка дополнительно содержит антисмысловую кРНК, кшРНК или миРНК для снижения эндогенных уровней СПТА.

282. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 201-277, отличающиеся тем, что клетка или Т-клетка дополнительно содержит последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий домен антитела CD70 и удерживающий в ЭПР домен.

283. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 201-277, отличающиеся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен.

284. Клетка или Т-клетка по п. 283, отличающиеся тем, что последовательность, кодирующая TFP, и последовательность, кодирующая слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен, содержатся в одном и том же опероне.

285. Клетка или Т-клетка по п. 283 или п. 284, отличающиеся тем, что удерживающий в ЭПР домен кодируется любой из SEQ ID NO: 756-779.

286. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 283-285, отличающиеся тем, что последовательность, кодирующая слитый белок, дополнительно содержит трансмембранный домен CD8-альфа между доменом антитела к CD70 и удерживающим в ЭПР доменом.

287. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 283-286, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая слитый белок, дополнительно содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид CD8-альфа, которая находится на 5'-конце от последовательности, кодирующей домен антитела к CD70.

288. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 201-277, отличающиеся тем, что домен антитела содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 105-175.

289. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 201-277, отличающиеся тем, что клетка или Т-клетка содержит CD70, экспрессируемый на клеточной поверхности, связанный с антителом к CD70.

290. Клетка или Т-клетка по п. 289, отличающаяся тем, что антитело к CD70 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой по пп. 105-175.

291. Клетка или Т-клетка по п. 289, отличающаяся тем, что антитело к CD70 имеет большую аффинность к CD70, чем антитело или антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой по пп. 105-175.

292. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 201-291, отличающаяся тем, что клетка или Т-клетка дополнительно содержит гетерологичную последовательность, кодирующую ингибирующую молекулу, содержащую первый полипептид, содержащий по меньшей

мере часть ингибирующей молекулы, связанную со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал от внутриклеточного сигнального домена.

293. Клетка или Т-клетка по любому из пп. 201-292, отличающаяся тем, что клетка или Т-клетка дополнительно содержит гетерологичную последовательность, кодирующую константный домен TCR.

294. Клетка или Т-клетка по п. 293, отличающаяся тем, что константный домен TCR представляет собой константный домен TCR-альфа или его часть, константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-альфа или его часть и константный домен TCR-бета или его часть, константный домен TCR-гамма или его часть, константный домен TCR-дельта или его часть или константный домен TCR-гамма или его часть и константный домен TCR-дельта или его часть.

295. Клетка или Т-клетка по п. 294, отличающаяся тем, что константный домен TCR-альфа или константный домен TCR-бета является мышинным.

296. Клетка по п. 201 или 202 или Т-клетка по п. 209 или 210, отличающаяся тем, что клетка или Т-клетка содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 1233, 1236, 1240 и 1264.

297. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку или Т-клетку по любому из пп. 201-296 и фармацевтически приемлемый носитель.

298. Способ получения клетки или Т-клетки по п. 278, включающий:  
нарушение эндогенного гена CD70 с получением таким образом клетки или Т-клетки, имеющей функциональное нарушение эндогенного гена CD70; и

трансдукции клетки или Т-клетки, имеющей функциональное нарушение эндогенного гена CD70, рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-104, 177, 178, и 179, или вектором по любому из пп. 190 и 193-200.

299. Способ по п. 298, отличающийся тем, что нарушение включает трансдукцию клетки или Т-клетки белком нуклеазой или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок нуклеазу, нацеленный на эндогенный ген CD70.

300. Способ по п. 298 или п. 299, отличающийся тем, что способ дополнительно включает нарушение эндогенного TCR.

301. Способ получения клетки или Т-клетки по п. 278, включающий трансдукцию клетки или Т-клетки, включающий нарушение эндогенного гена CD70 рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-104, 177, 178, и 179, или вектор по любому из пп. 190 и 193-200.

302. Способ по п. 301, отличающийся тем, что клетка или Т-клетка дополнительно имеет нарушение эндогенного TCR.

303. Способ получения клетки или Т-клетки по любому из пп. 201-277 и 289-291, включающий:

трансдукцию клетки или Т-клетки рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-104, 177, 178, и 179, или вектором по любому из пп. 190 и 193-200; и

приведение в контакт клетки или Т-клетки с антителом к CD70, которое связывается с CD70 на поверхности клетки.

304. Способ по п. 303, отличающийся тем, что антитело к CD70 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый рекомбинантной нуклеиновой кислотой по пп. 105-175.

305. Способ по п. 304, отличающийся тем, что антитело к CD70 имеет большую аффинность к CD70, чем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемые рекомбинантной нуклеиновой кислотой по пп. 105-175.

306. Способ по любому из пп. 303-305, отличающийся тем, что приведение в контакт проводят до трансдукции.

307. Способ по п. 306, отличающийся тем, что приведение в контакт проводят за 1 день до трансдукции.

308. Способ по любому из пп. 303-305, отличающийся тем, что приведение в контакт проводят после трансдукции.

309. Способ по п. 308, отличающийся тем, что приведение в контакт проводят в течение 5 дней после трансдукции.

310. Способ по любому из пп. 303-305, дополнительно включающий субкультивирование клеток в среде, не содержащей антитело к CD70, через 4 или более дней после трансдукции.

311. Способ по п. 310, отличающийся тем, что субкультивирование включает субкультивирование клеток в среде, не содержащей антитело к CD70, через 7 или более дней после трансдукции.

312. Способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п. 297.

313. Способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей (а) клетку или Т-клетку по любому из пп. 201-296; и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

314. Способ по п. 312 или п. 313, отличающийся тем, что злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование, связанное с повышенной экспрессией CD70.

315. Способ по любому из пп. 312-314, дополнительно включающий введение субъекту агента, который повышает уровни CD70 в раковых клетках.

316. Способ по п. 315, отличающийся тем, что агент, который повышает уровень CD70, представляет собой гипометилирующий агент.

317. Способ по п. 316, отличающийся тем, что гипометилирующий агент представляет собой 5-азациитидин или децитабин.

318. Способ по любому из пп. 312-317, отличающийся тем, что заболевание или патологическое состояние выбрано из группы, состоящей из Т-клеточной лимфомы,

диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), мантийно-клеточной лимфомы (MCL), острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластического синдрома (MDS), вируса Эпштейна-Барра (EBV) + злокачественного новообразования и/или вируса папилломы человека (HPV) + злокачественного новообразования.

319. Способ по любому из пп. 312-317, отличающийся тем, что заболевание или патологическое состояние выбрано из группы, состоящей из рака почки, почечно-клеточного рака, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, рака носоглотки, мезотелиомы, глиобластомы, рака тимуса, рака молочной железы, рака головы и рака шеи и рака желудка.

320. Способ по любому из пп. 312-319, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека.

321. Способ получения клетки или Т-клетки по п. 279, включающий:  
нарушение эндогенного гена СПТА с получением таким образом клетки или Т-клетки, имеющей функциональное нарушение эндогенного гена СПТА; и  
трансдукции клетки или Т-клетки, имеющей функциональное нарушение эндогенного гена СПТА, рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-104, 177, 178, и 179, или вектором по любому из пп. 190 и 193-200.

322. Способ по п. 321, отличающийся тем, что нарушение включает трансдукцию клетки или Т-клетки белком нуклеазой или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок нуклеазу, нацеленный на эндогенный ген СПТА.

323. Способ по п. 321 или п. 322, отличающийся тем, что способ дополнительно включает нарушение эндогенного TCR.

324. Способ получения клетки или Т-клетки по п. 279, включающий трансдукцию клетки или Т-клетки, включающий нарушение эндогенного гена СПТА рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-104, 177, 178, и 179, или вектор по любому из пп. 190 и 193-200.

325. Способ по п. 324, отличающийся тем, что клетка или Т-клетка дополнительно имеет нарушение эндогенного TCR.

326. Способ получения клетки или Т-клетки по любому из пп. 282-288, включающий трансдукцию клетки или Т-клетки рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-104, 177, 178, и 179, или вектором по любому из пп. 190 и 193-200 и последовательностью, кодирующей слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен.

327. Способ по п. 326, отличающийся тем, что рекомбинантную нуклеиновую кислоту или вектор и последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен, трансдуцируют одновременно.

328. Способ по п. 327, отличающийся тем, что рекомбинантная нуклеиновая кислота или вектор содержат последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен.

329. Способ по п. 328, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая

TFP, и последовательность, кодирующая слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен, содержатся в одном и том же опероне.

330. Способ по п. 326, отличающийся тем, что рекомбинантную нуклеиновую кислоту или вектор трансдуцируют до или после последовательности, кодирующей слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен.

331. Способ по любому из пп. 326-330, отличающийся тем, что удерживающий в ЭПР домен кодируется любой из SEQ ID NO: 756-779.

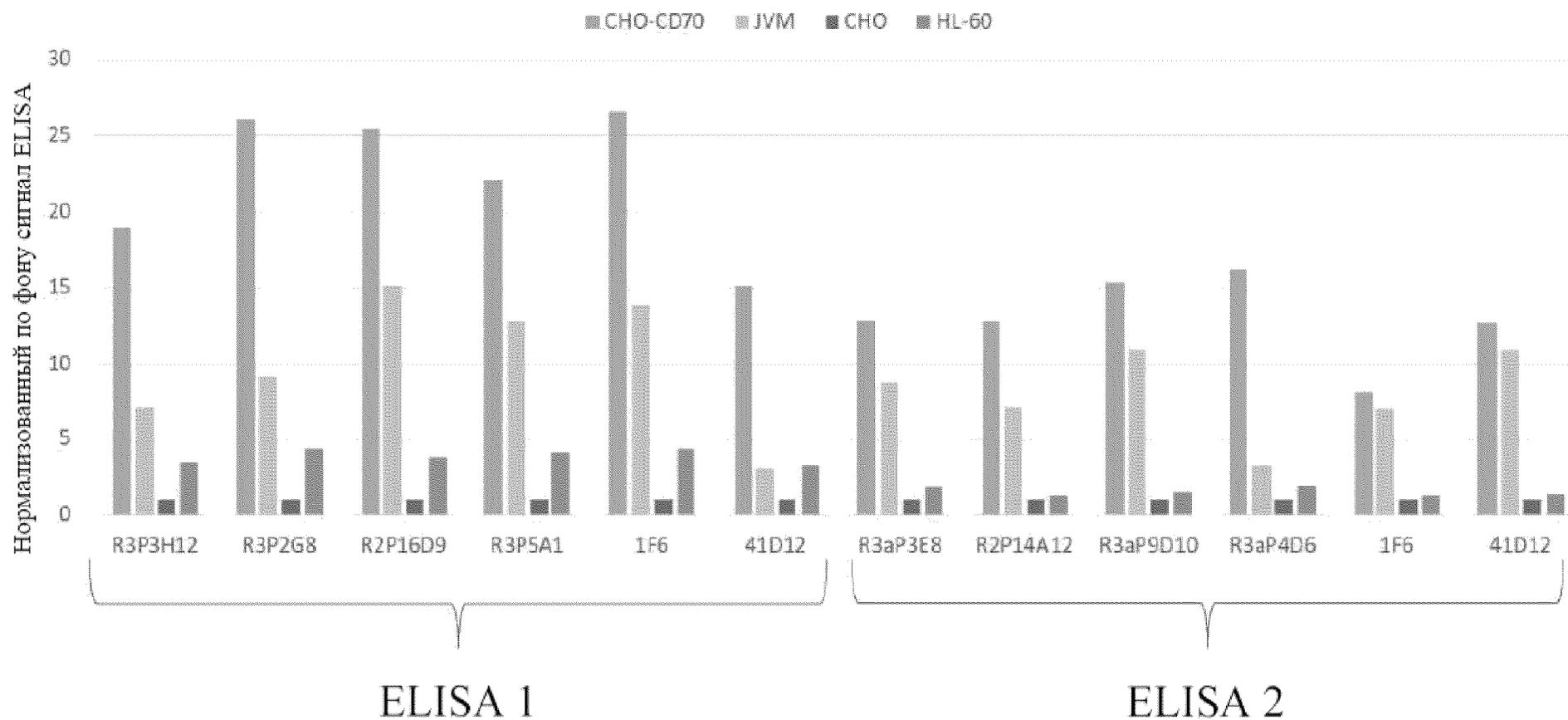
332. Способ по любому из пп. 326-331, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен, дополнительно содержит трансмембранный домен CD8-альфа между доменом антитела к CD70 и удерживающим в ЭПР доменом.

333. Способ по любому из пп. 326-332, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая слитый белок, содержащий домен антитела к CD70 и удерживающий в ЭПР домен, дополнительно содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид CD8-альфа, которая находится на 5'-конце от последовательности, кодирующей домен антитела к CD70.

334. Способ по любому из пп. 326-333, отличающийся тем, что домен антитела включает антитело к CD70 по любому из пп. 105-175.

По доверенности

Результаты для ELISA связывания клеток

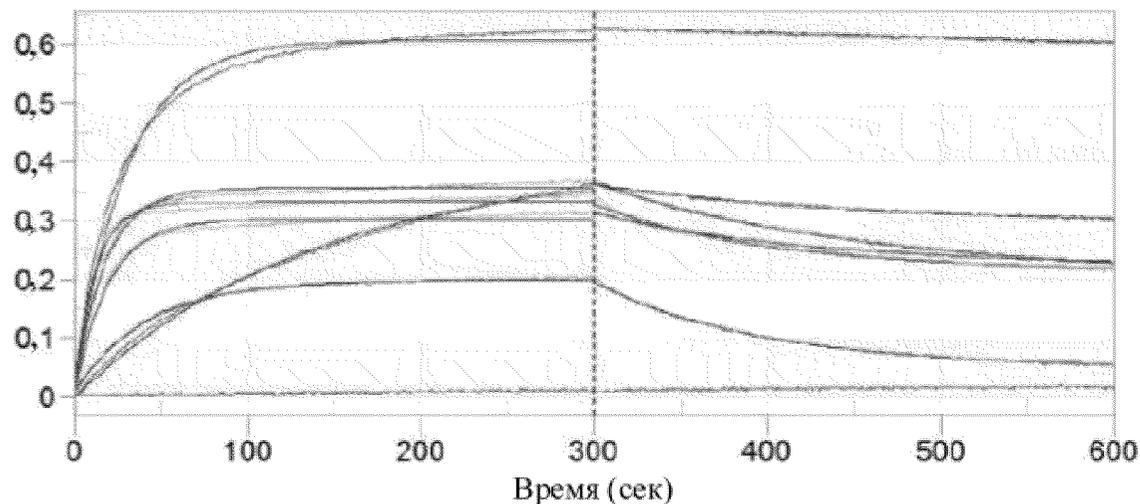
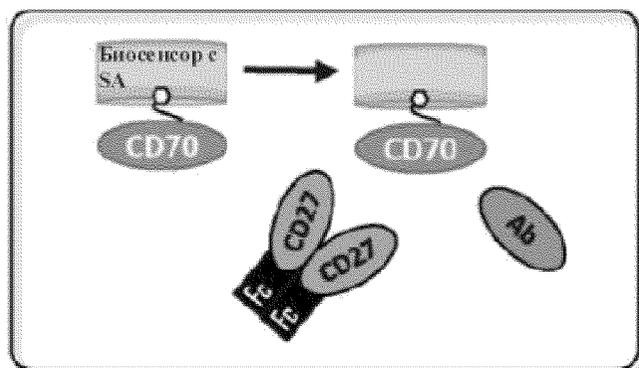


1/118

ФИГ. 1

# Анализ связывания Octet

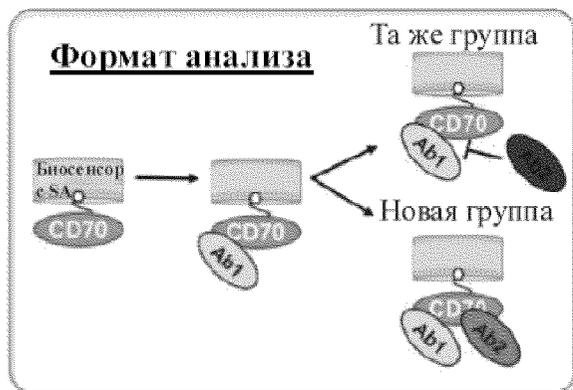
CD70-His-Avi + CD27His-Fc



Связывающий компонент	KD (нМ)	kon (с-1)	koff (М-1*с-1)
CD27-Fc	1,7	$3,9 \times 10^6$	$6,6 \times 10^{-3}$
41D12 (LwH)	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^8$	$1,3 \times 10^{-5}$
Анти-HEL (отриц.)	Н/О	-	-
R3P3H12	$1,6 \times 10^{-1}$	$6,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^{-2}$
R3P5A1	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \times 10^8$	$6,1 \times 10^{-3}$
R3aP3E8	$2,7 \times 10^{-2}$	$3,6 \times 10^8$	$9,8 \times 10^{-3}$
R3aP9D10	$3,6 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^8$	$7,8 \times 10^{-3}$

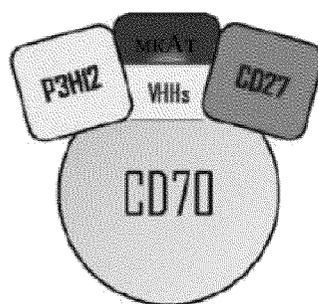
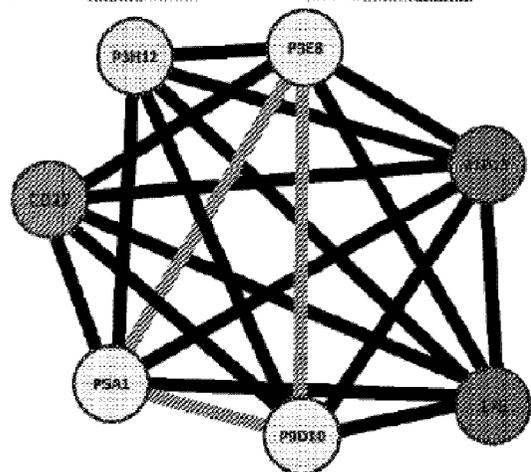
ФИГ. 2

# Эпитоп-специфическая сортировка

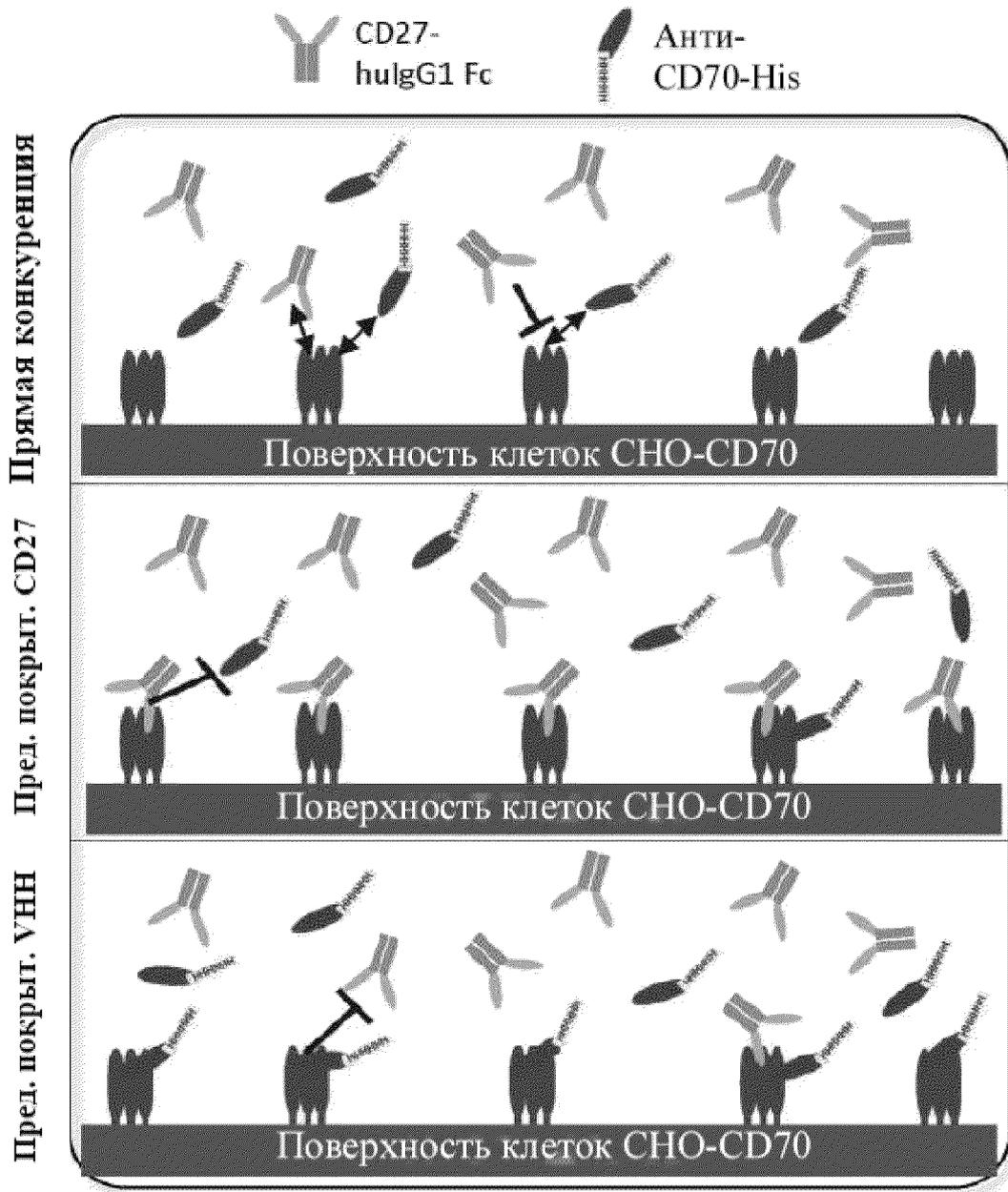


		At2						
		1F6	41D12	CD27Fc	R3AP3E8	R3AP9D10	R3P3H12	R3P5A1
At1	1F6	0,09	0,14	0,11	-0,01	0,02	0,06	0,00
	41D12	0,06	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04
	CD27Fc	0,54	0,54	0,08	0,26	0,24	0,20	0,28
	R3AP3E8	0,23	0,23	0,06	0,05	0,06	0,05	0,07
	R3AP9D10	0,28	0,31	0,06	0,09	0,04	0,06	0,09
	R3P3H12	0,59	0,56	0,24	0,24	0,16	0,03	0,21
	R3P5A1	0,27	0,27	0,08	0,09	0,07	0,06	0,05

$K_D$  1 нМ 1 пМ



ФИГ. 3



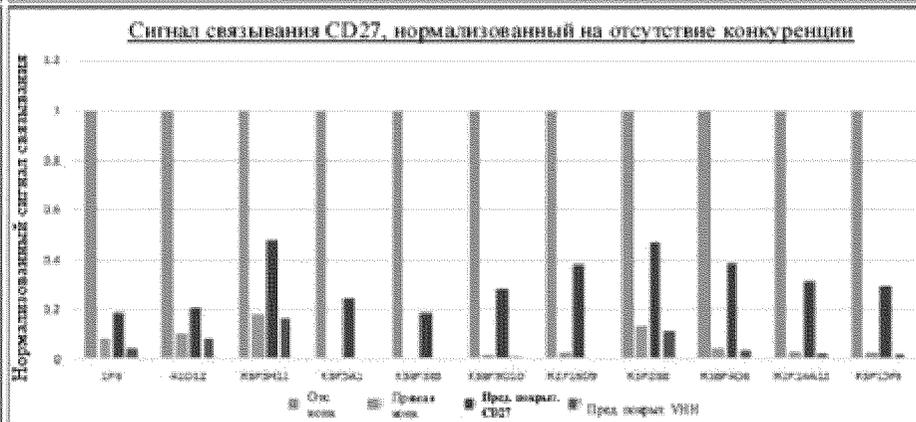
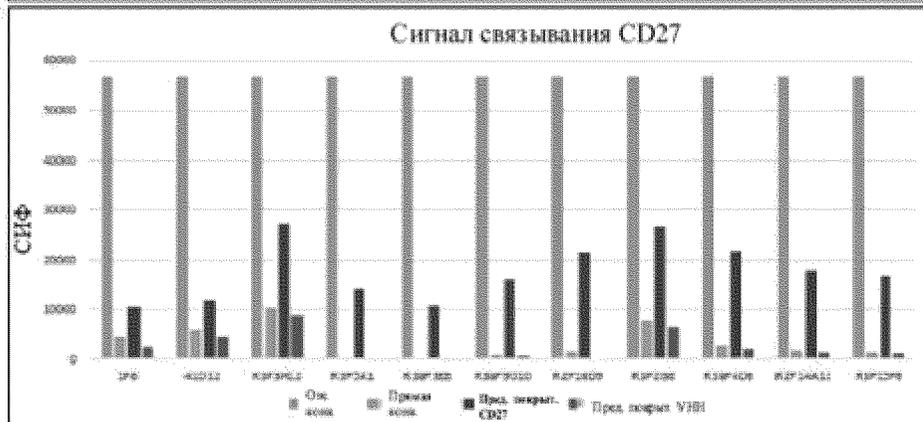
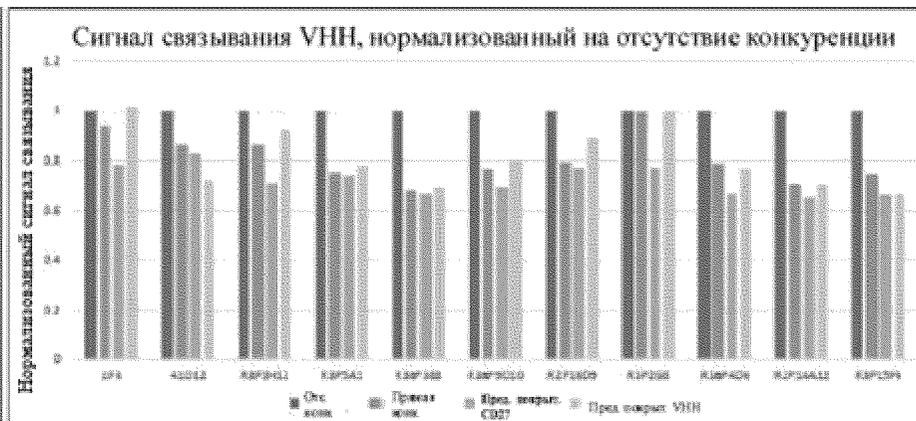
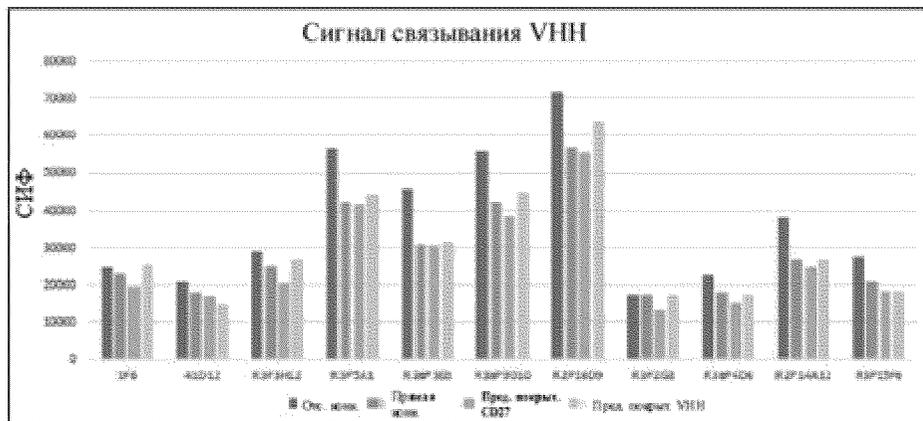
ФИГ. 4

Связывание VNH

Связывание CD27

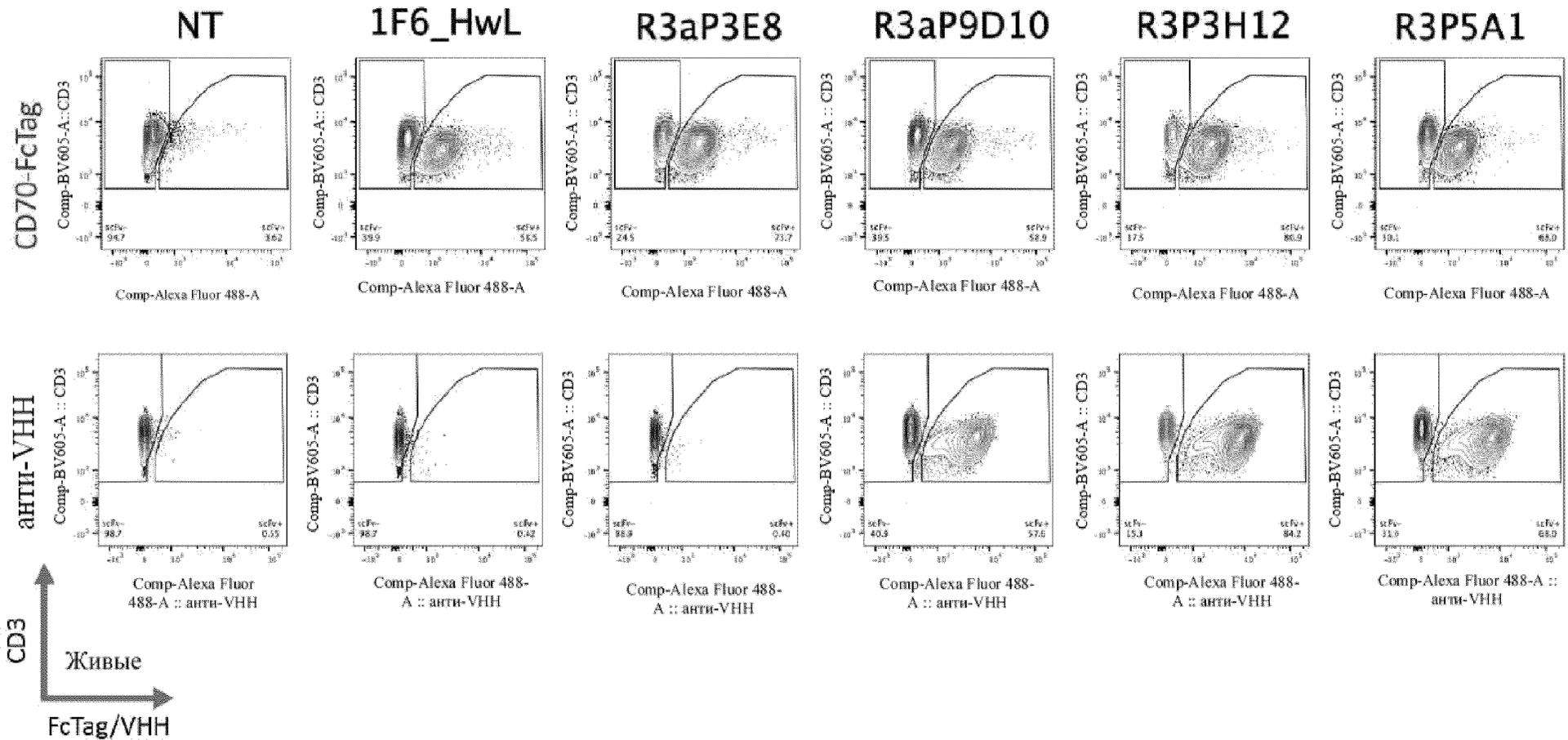
## Необработанный сигнал связывания

## Нормализованный сигнал связывания



ФИГ. 5

# Обнаружение TFR с помощью анти-VHN/CD70-Fc-метки

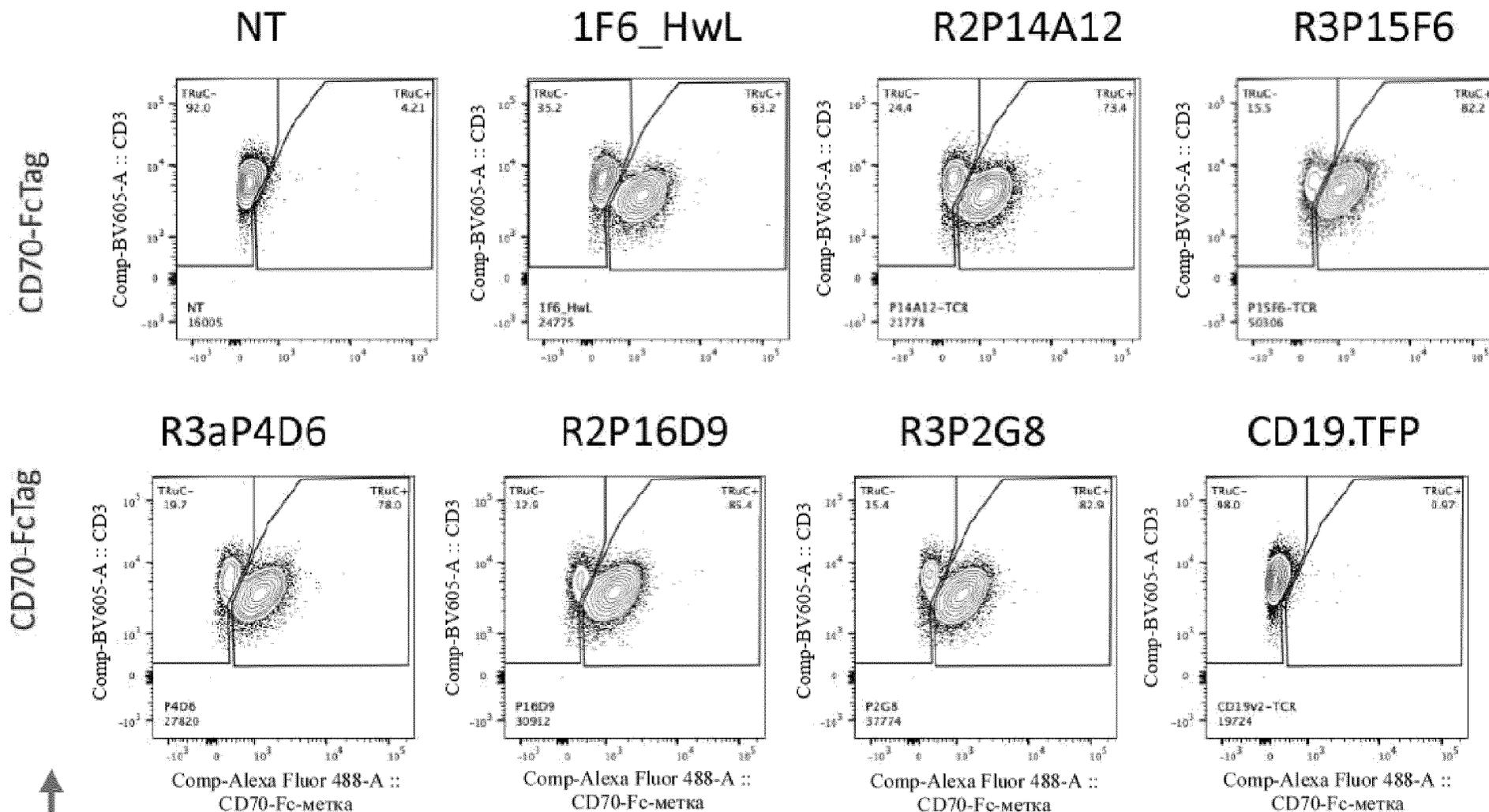


6/118

ФИГ. 6А



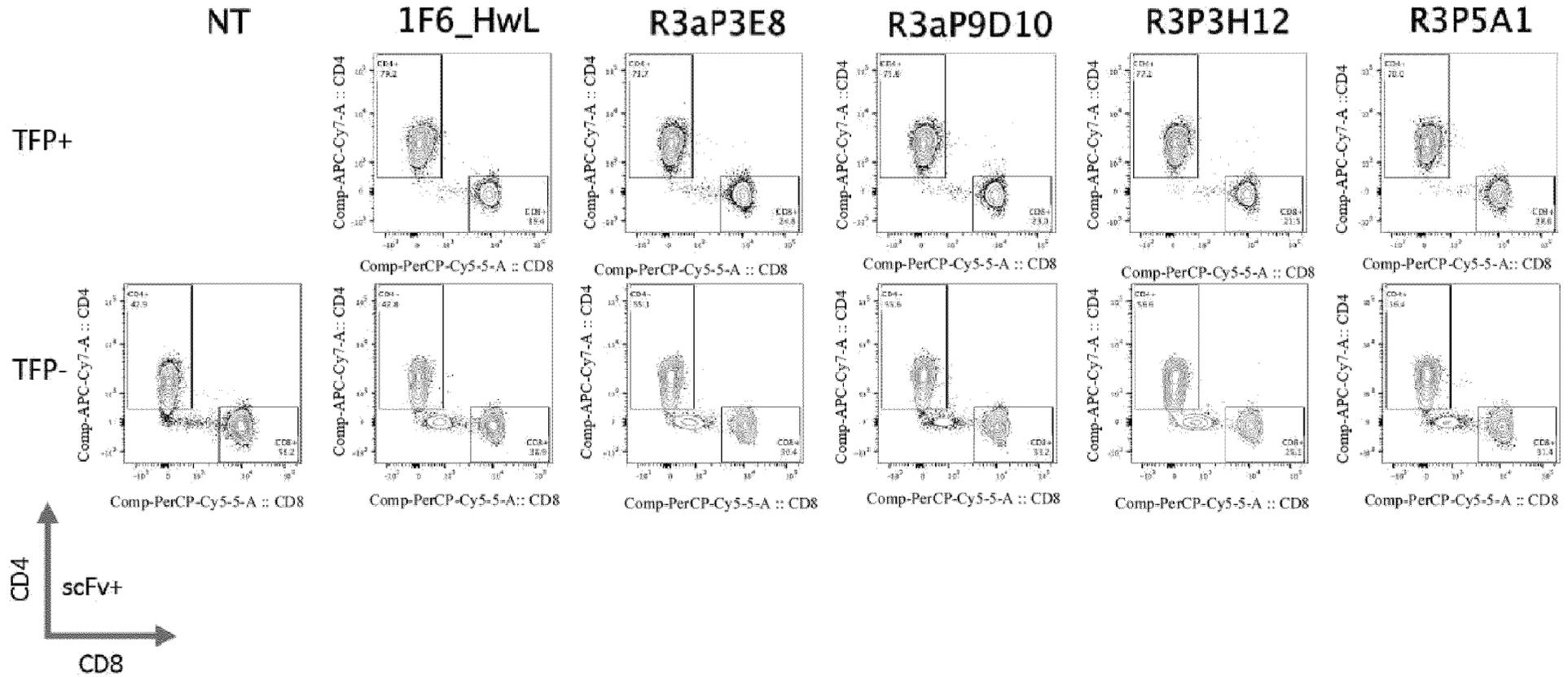
# Обнаружение TFP с помощью CD70-Fc-метки



CD3  
Живые  
VНН

ФИГ. 6С

# TFP+/- CD4 v CD8



9/118

ФИГ. 7А

# TFP+ CD4 v CD8

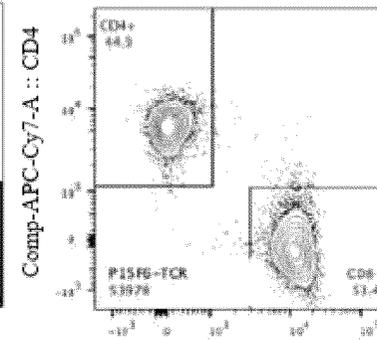
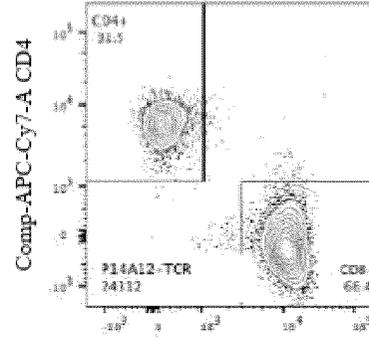
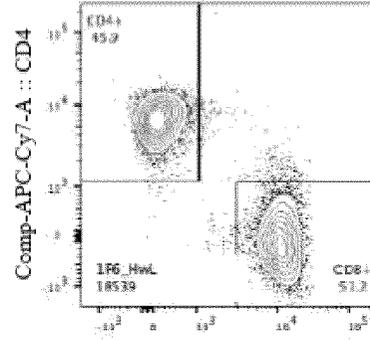
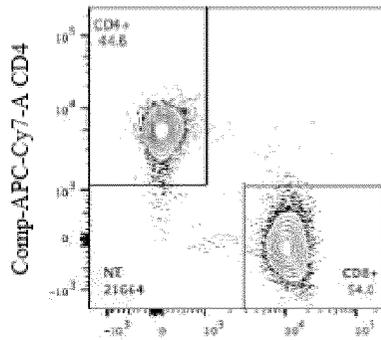
NT\*

1F6\_HwL

R2P14A12

R3P15F6

TFP+



R3aP4D6

R2P16D9

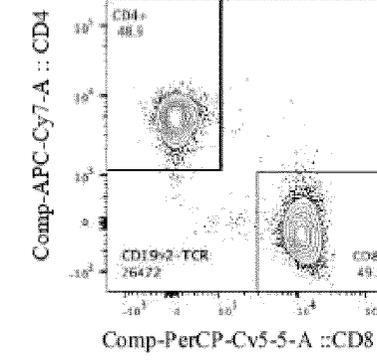
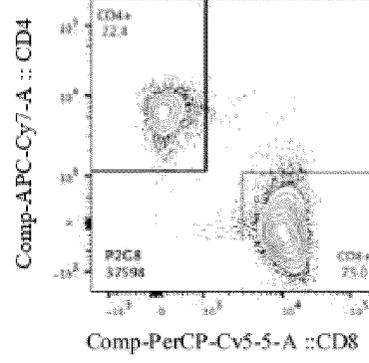
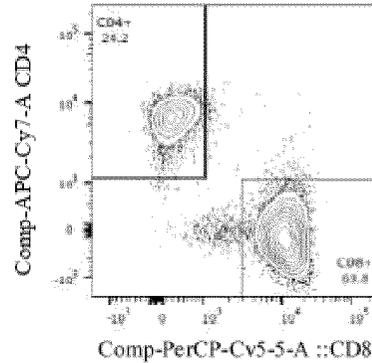
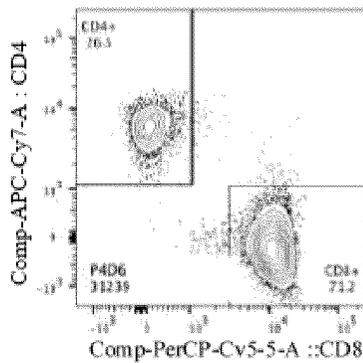
R3P2G8

CD19.TFP\*

TFP+

CD4

CD8



10/118

ФИГ. 7В

\* Отображает TCR-

# TFP- CD4 v CD8

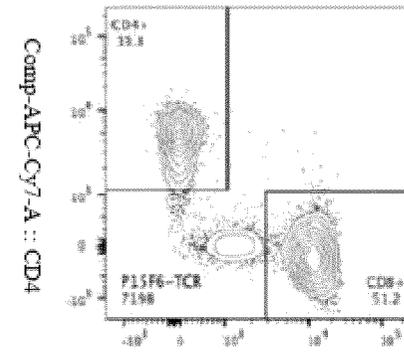
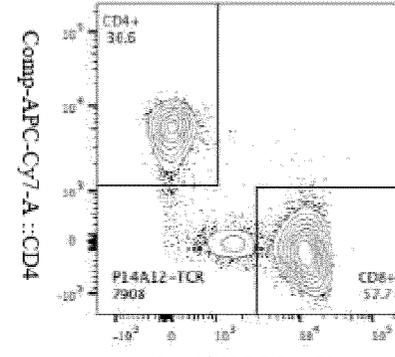
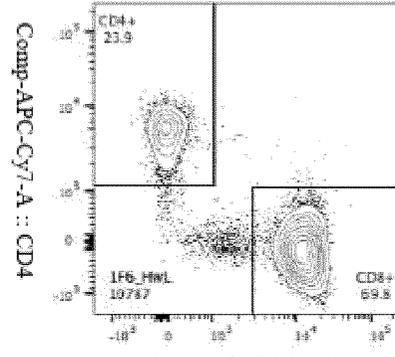
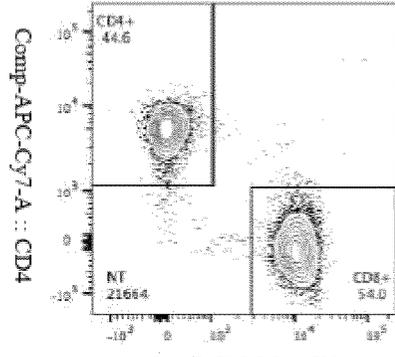
NT

1F6\_HwL

R2P14A12

R3P15F6

TFP-



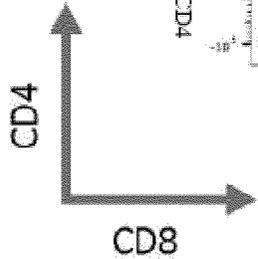
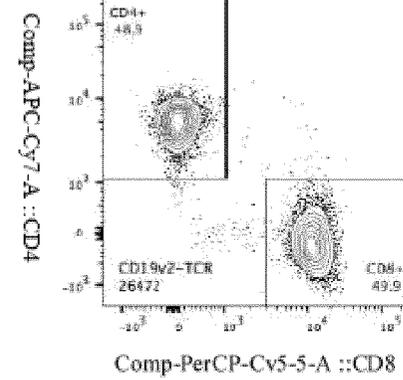
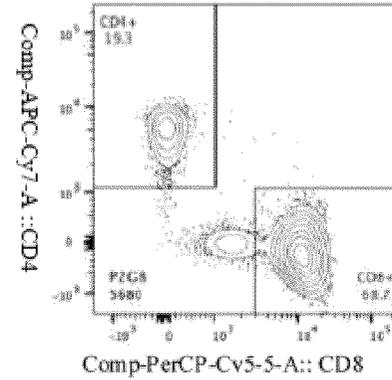
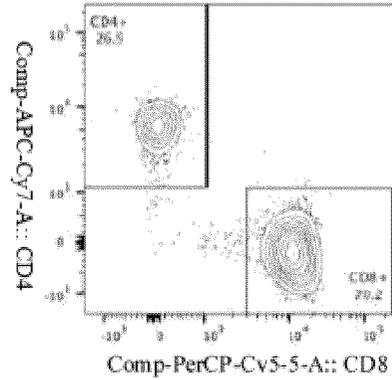
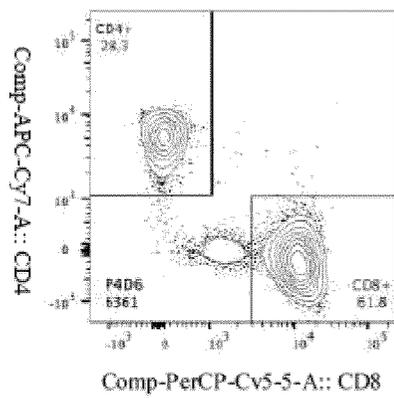
R3aP4D6

R2P16D9

R3P2G8

CD19.TFP

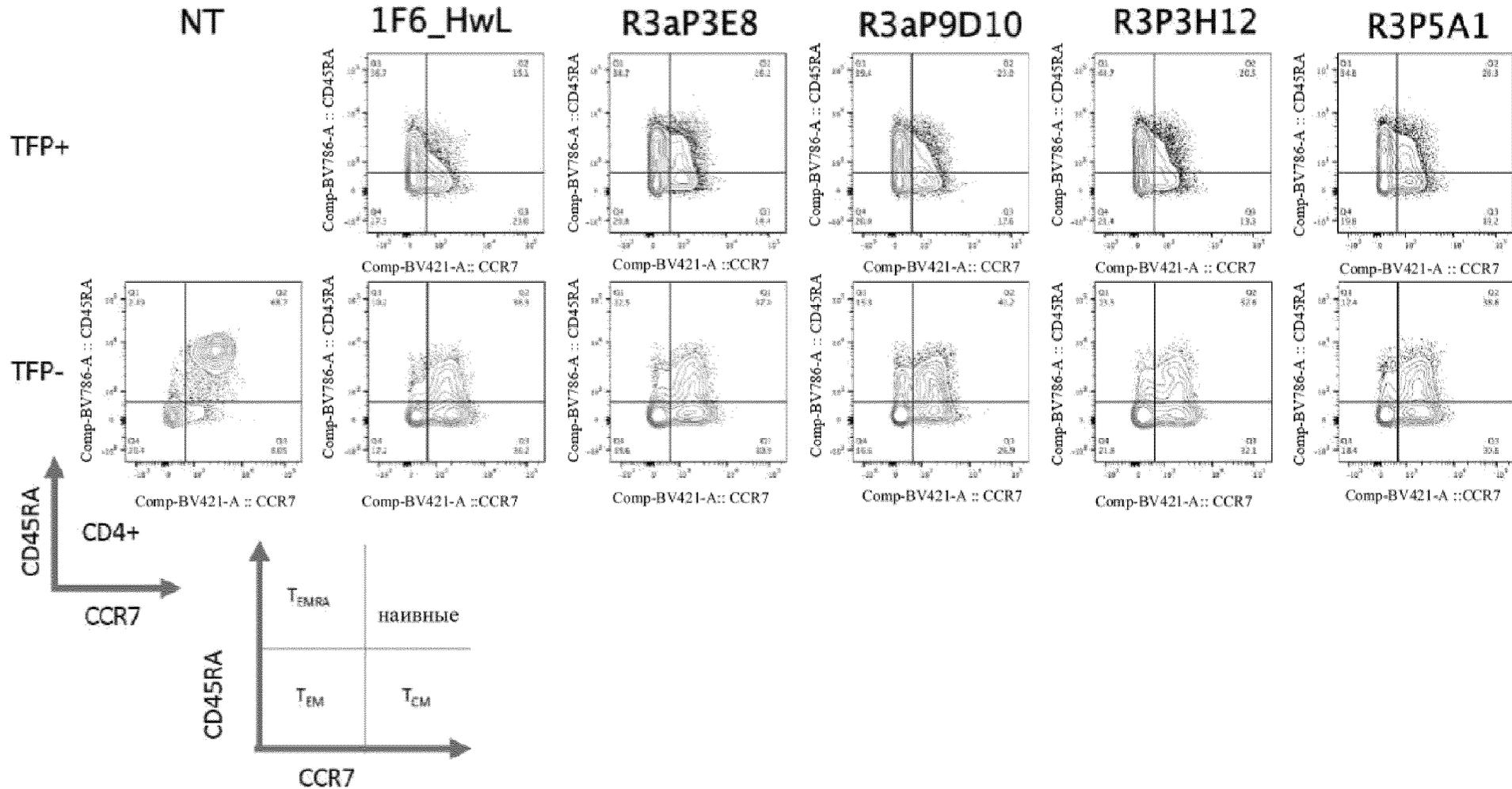
TFP-



11/118

ФИГ. 7С

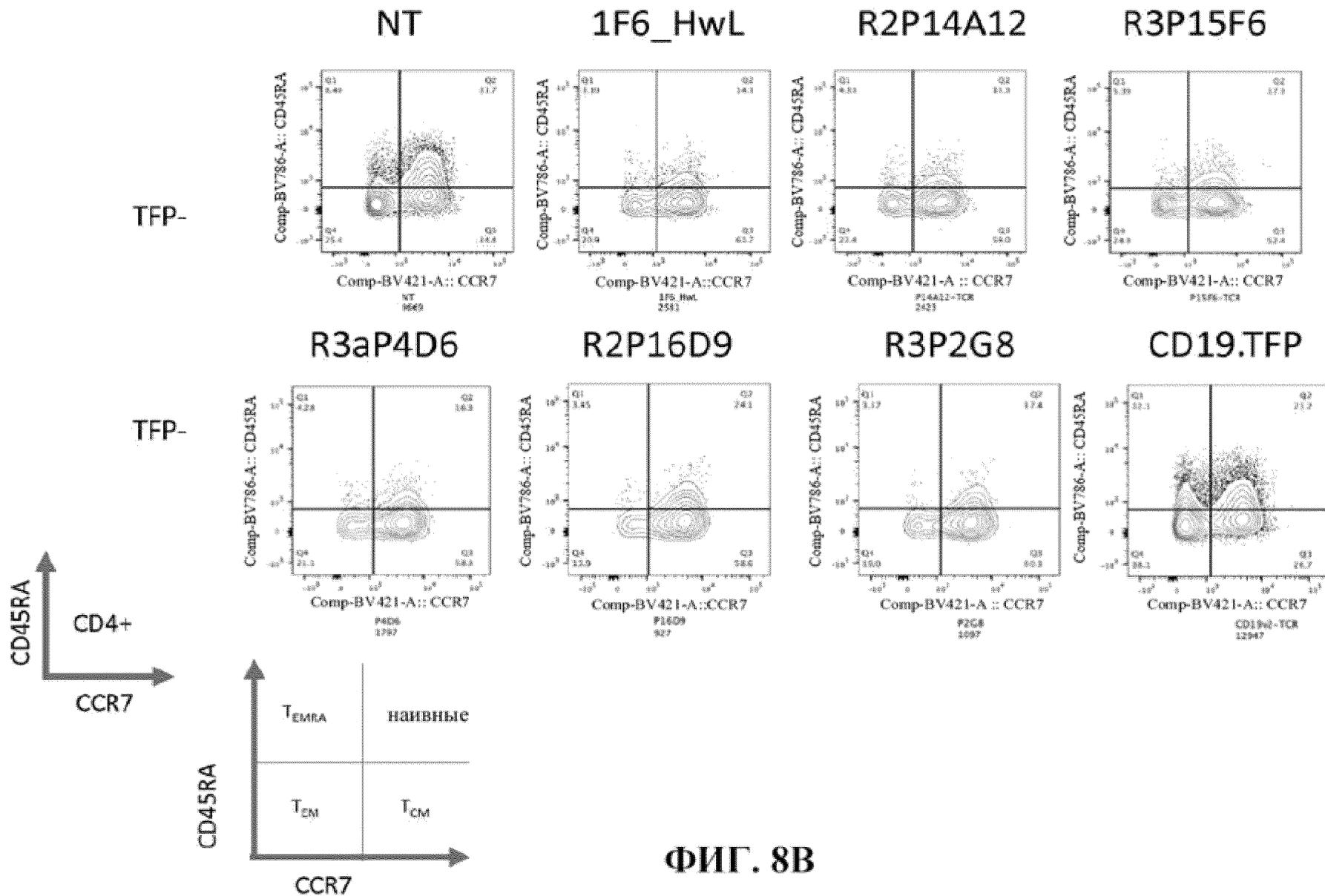
# Статус памяти CD4+TFP+/-Т-клеток



12/118

ФИГ. 8А

# Статус памяти CD4+TFP-T-клеток



# Статус памяти CD4+TFP+ Т-клеток

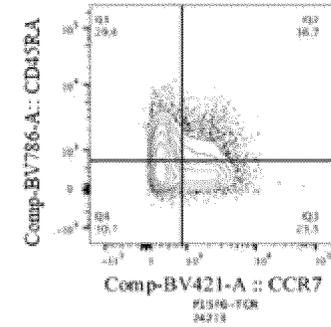
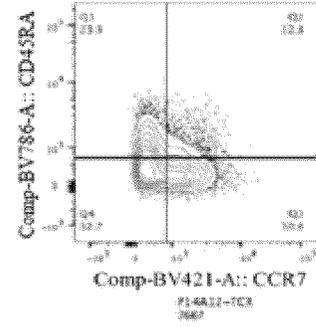
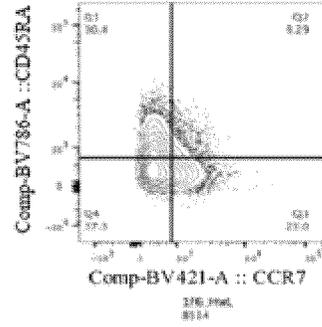
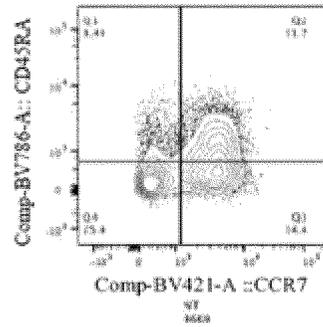
NT\*

1F6\_HwL

R2P14A12

R3P15F6

TFP+



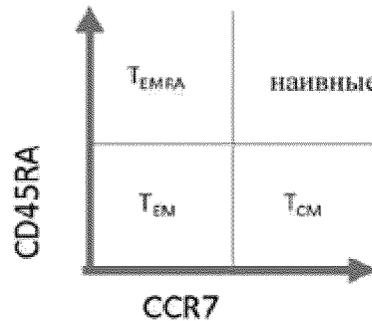
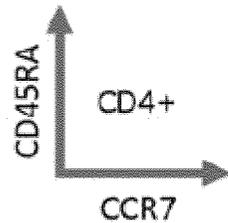
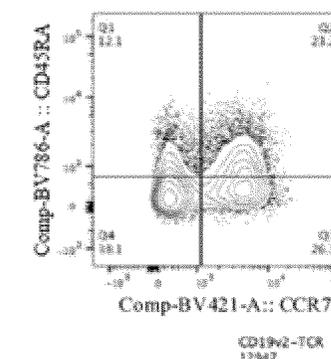
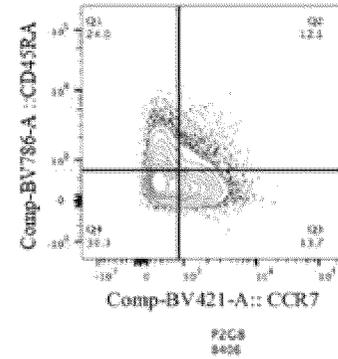
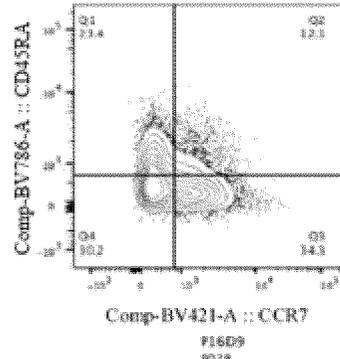
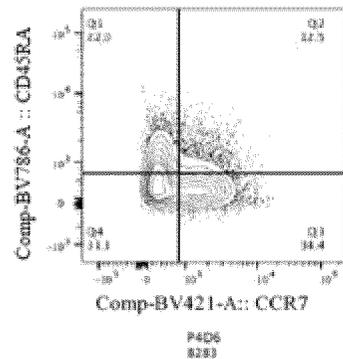
R3aP4D6

R2P16D9

R3P2G8

CD19.TFP\*

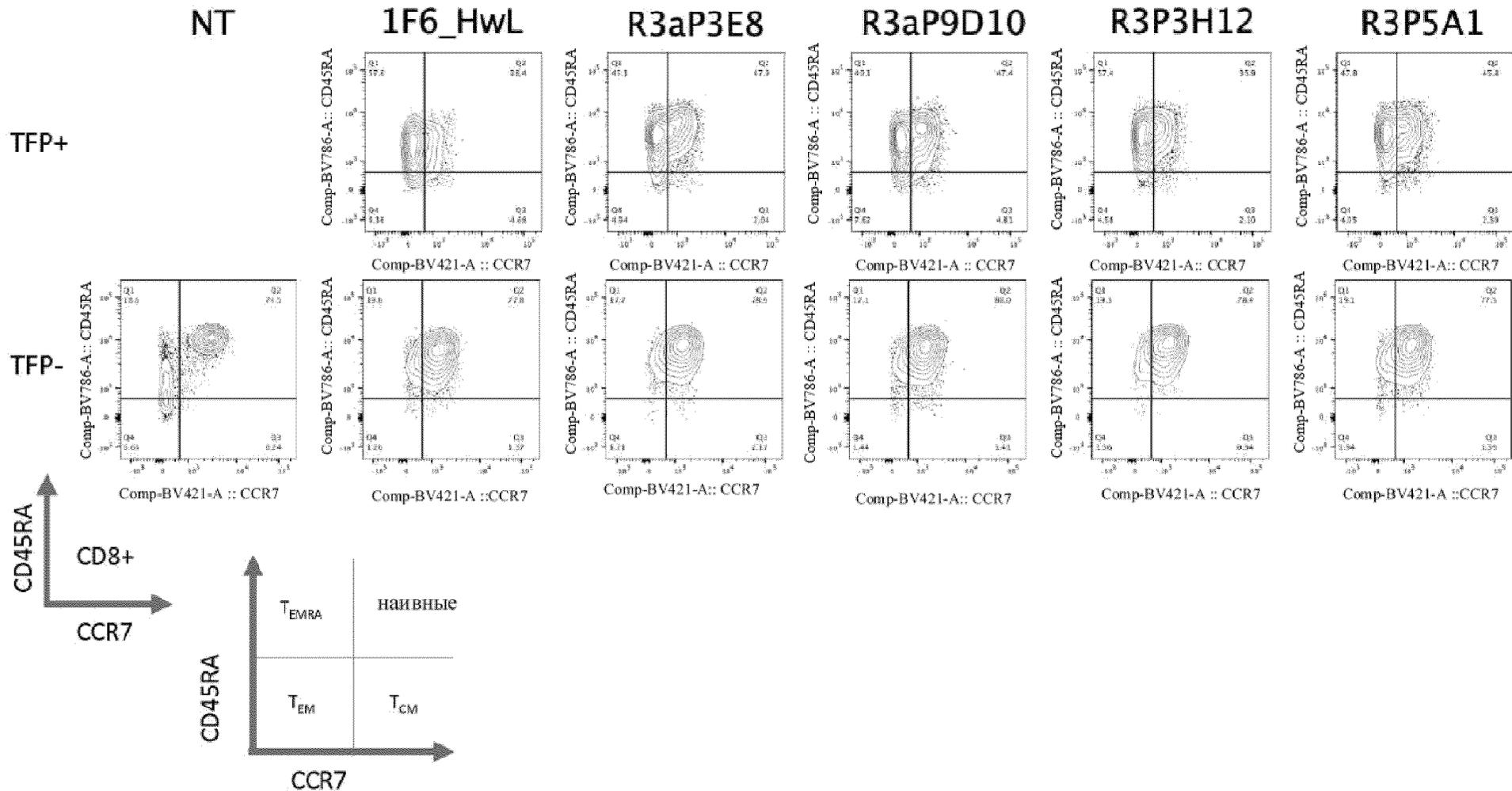
TFP+



\* Отображает TCR-

ФИГ. 8С

# Статус памяти CD8+TFP+/-Т-клеток

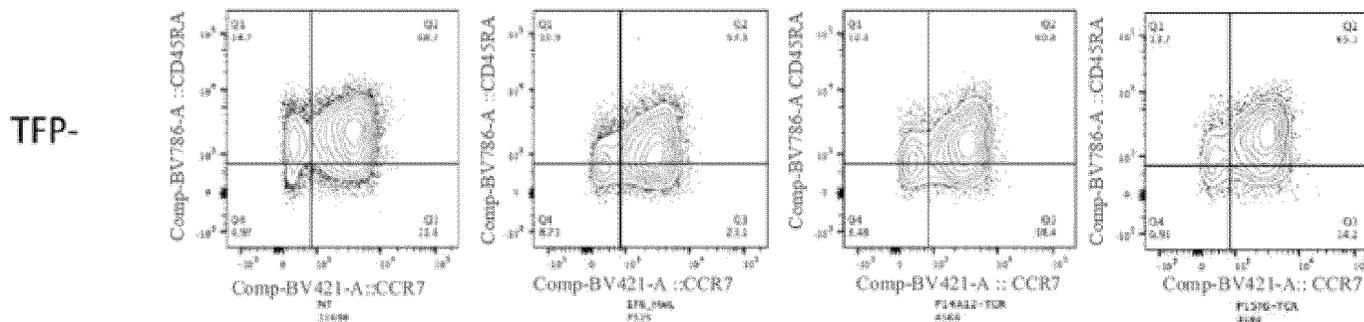


15/118

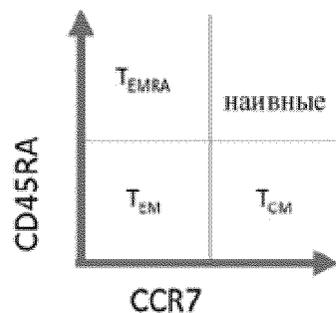
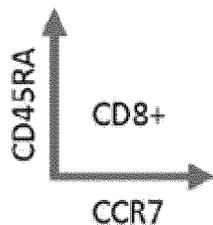
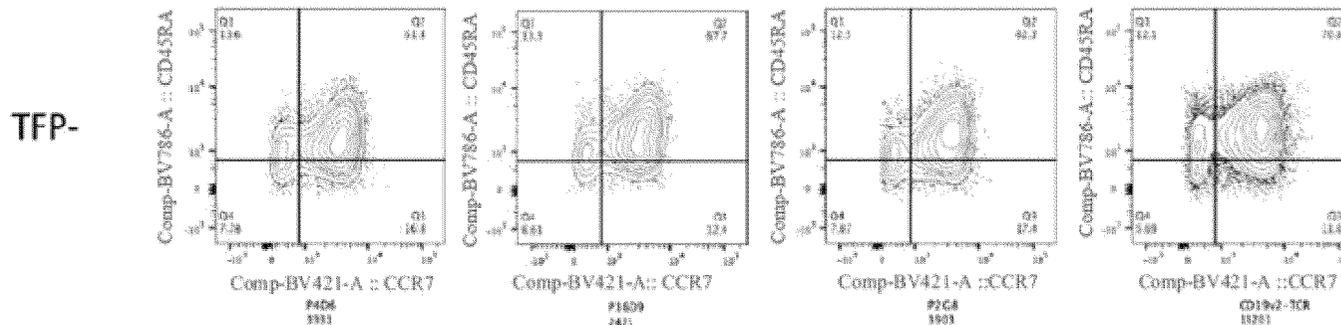
ФИГ. 8D

# Статус памяти CD8+TFP-T-клеток

NT 1F6\_HwL R2P14A12 R3P15F6



R3aP4D6 R2P16D9 R3P2G8 CD19.TFP



ФИГ. 8E

# Статус памяти CD8+TFP+ Т-клеток

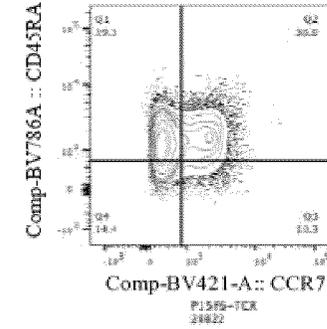
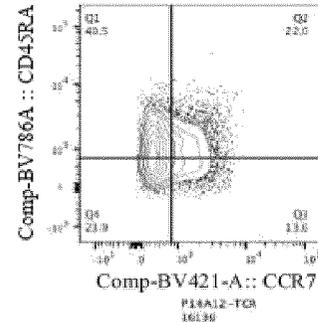
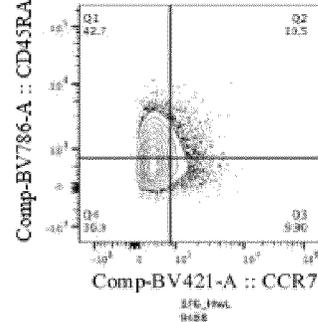
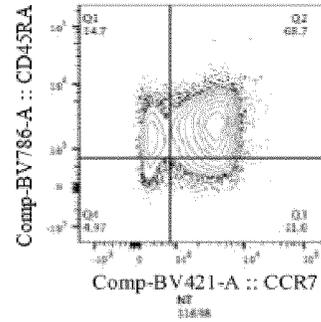
NT\*

1F6\_HwL

R2P14A12

R3P15F6

TFP+



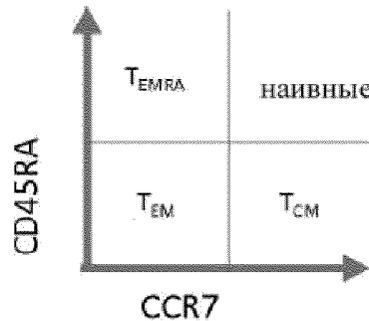
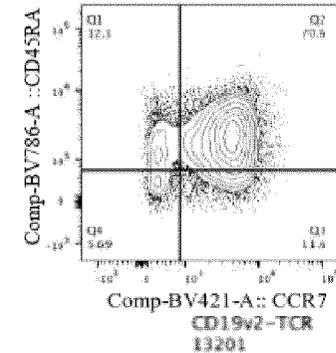
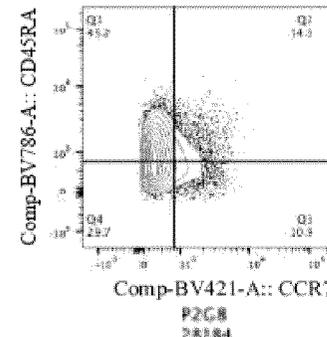
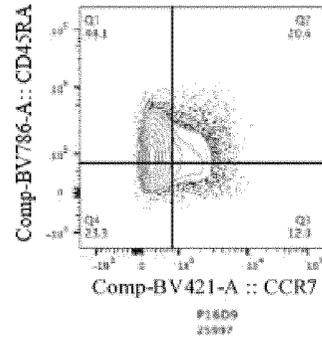
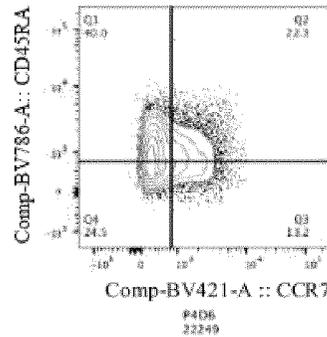
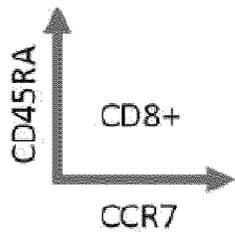
R3aP4D6

R2P16D9

R3P2G8

CD19.TFP\*

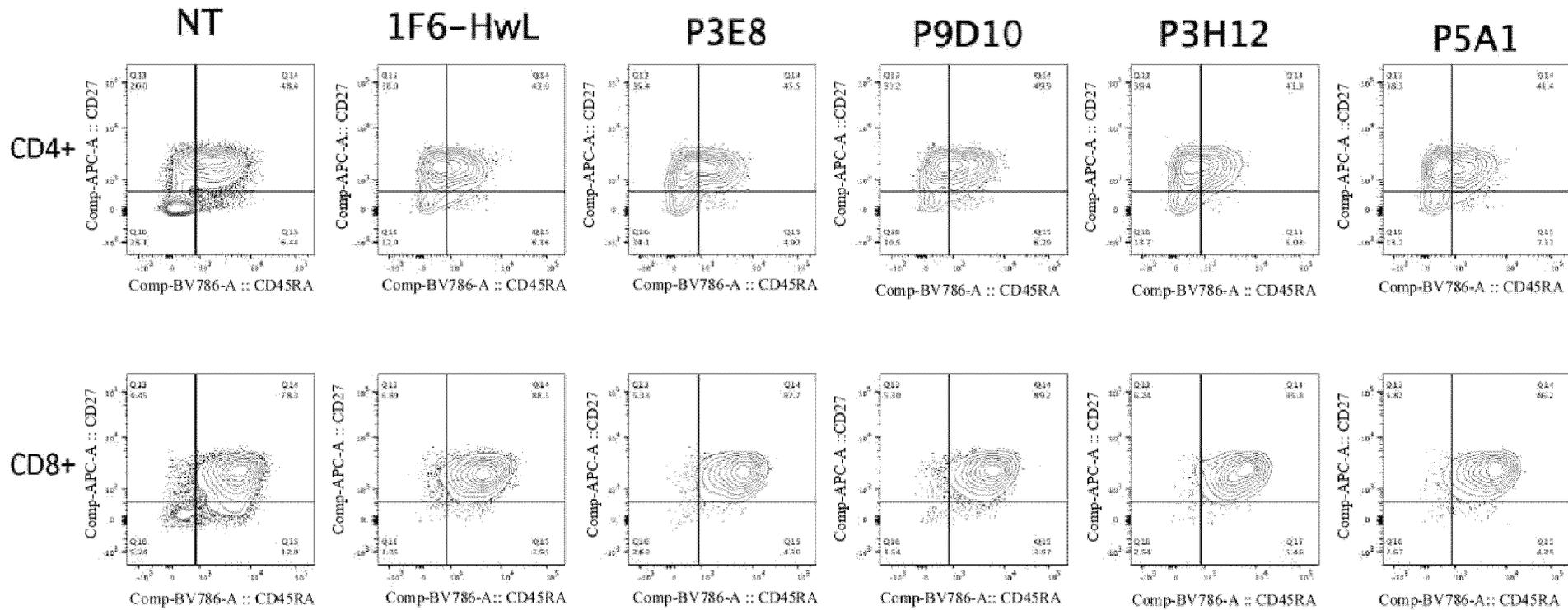
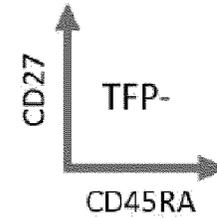
TFP+



\* Отображает TCR-

ФИГ. 8F

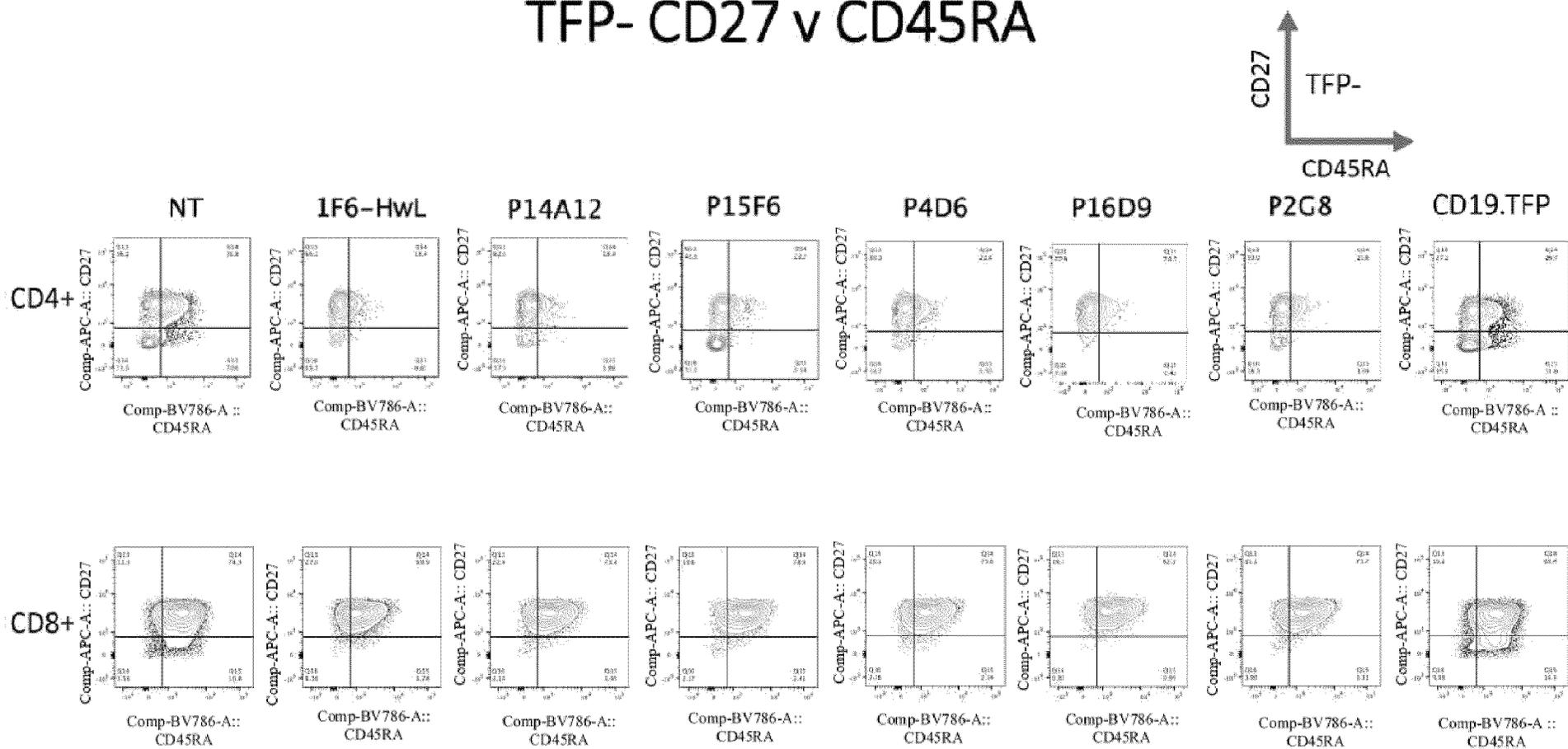
# TFP- CD27 v CD45RA



18/118

ФИГ. 9А

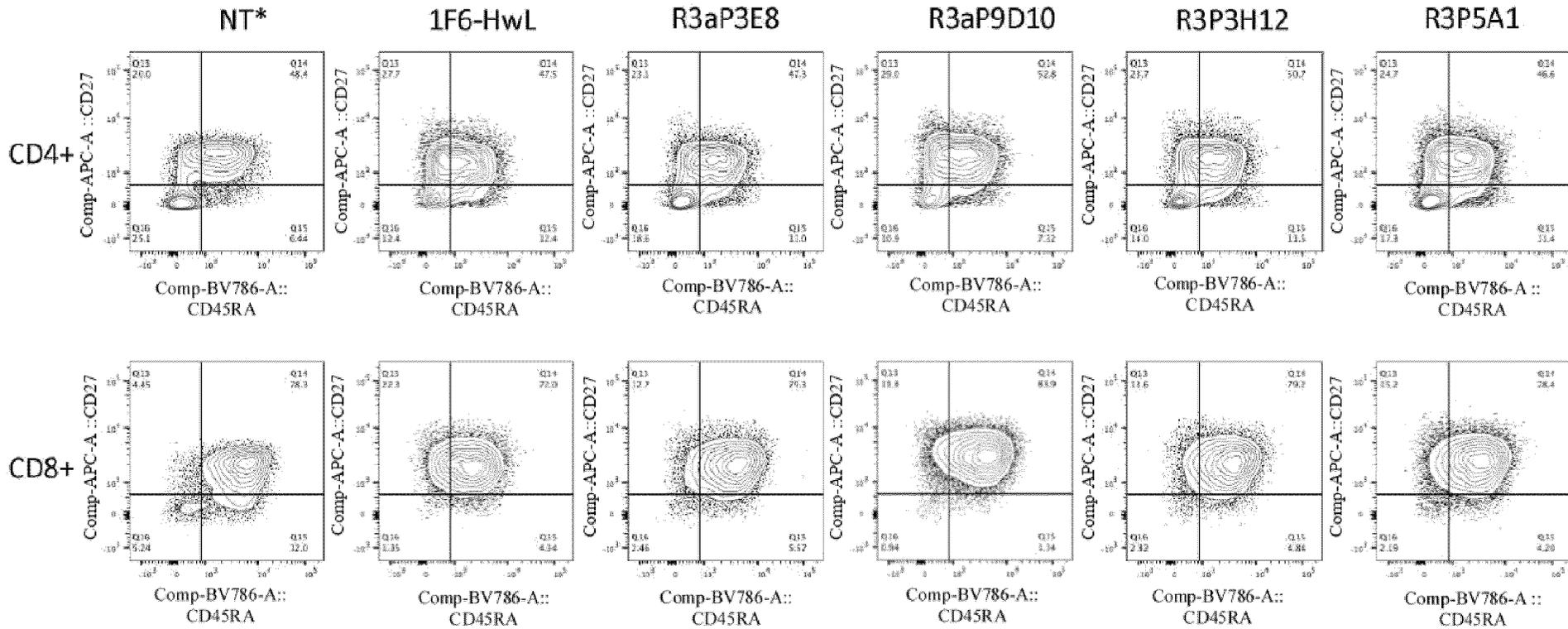
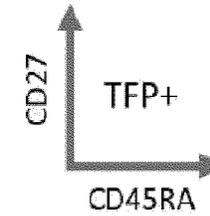
# TFP- CD27 v CD45RA



19/118

ФИГ. 9В

# TFP+ CD27 v CD45RA

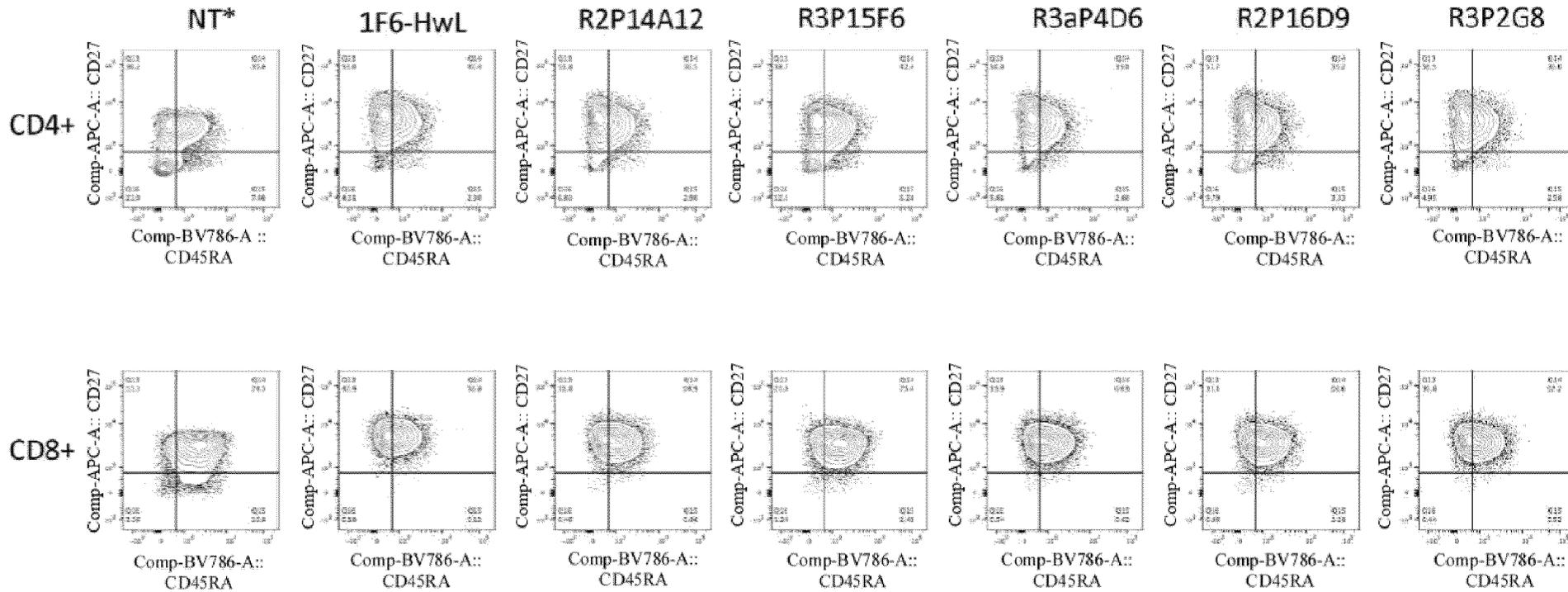
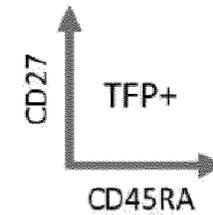


20/118

\* Отображает TCR-

ФИГ. 9С

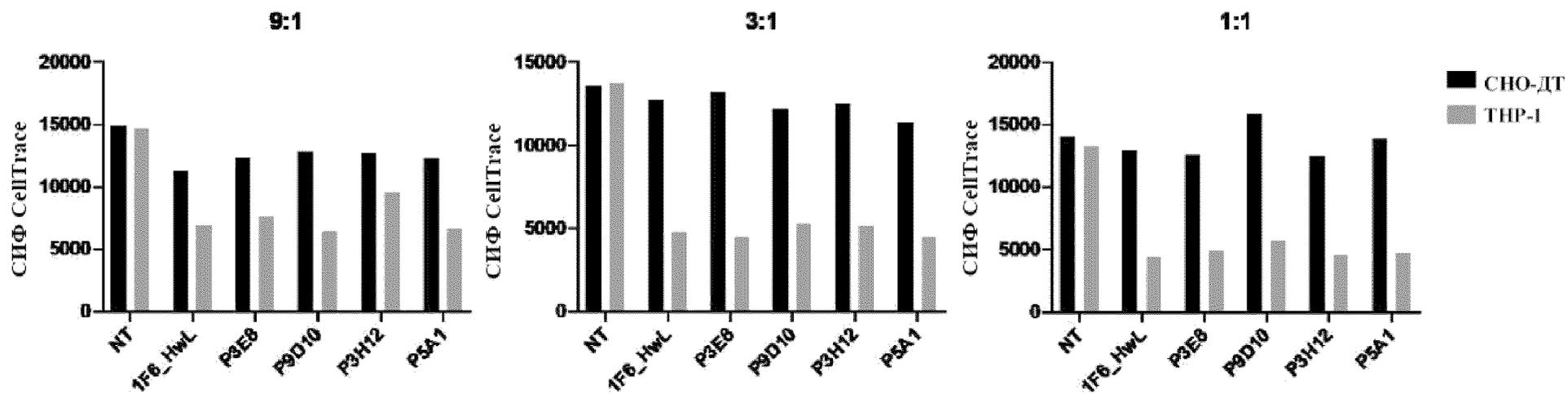
# TFP+ CD27 v CD45RA



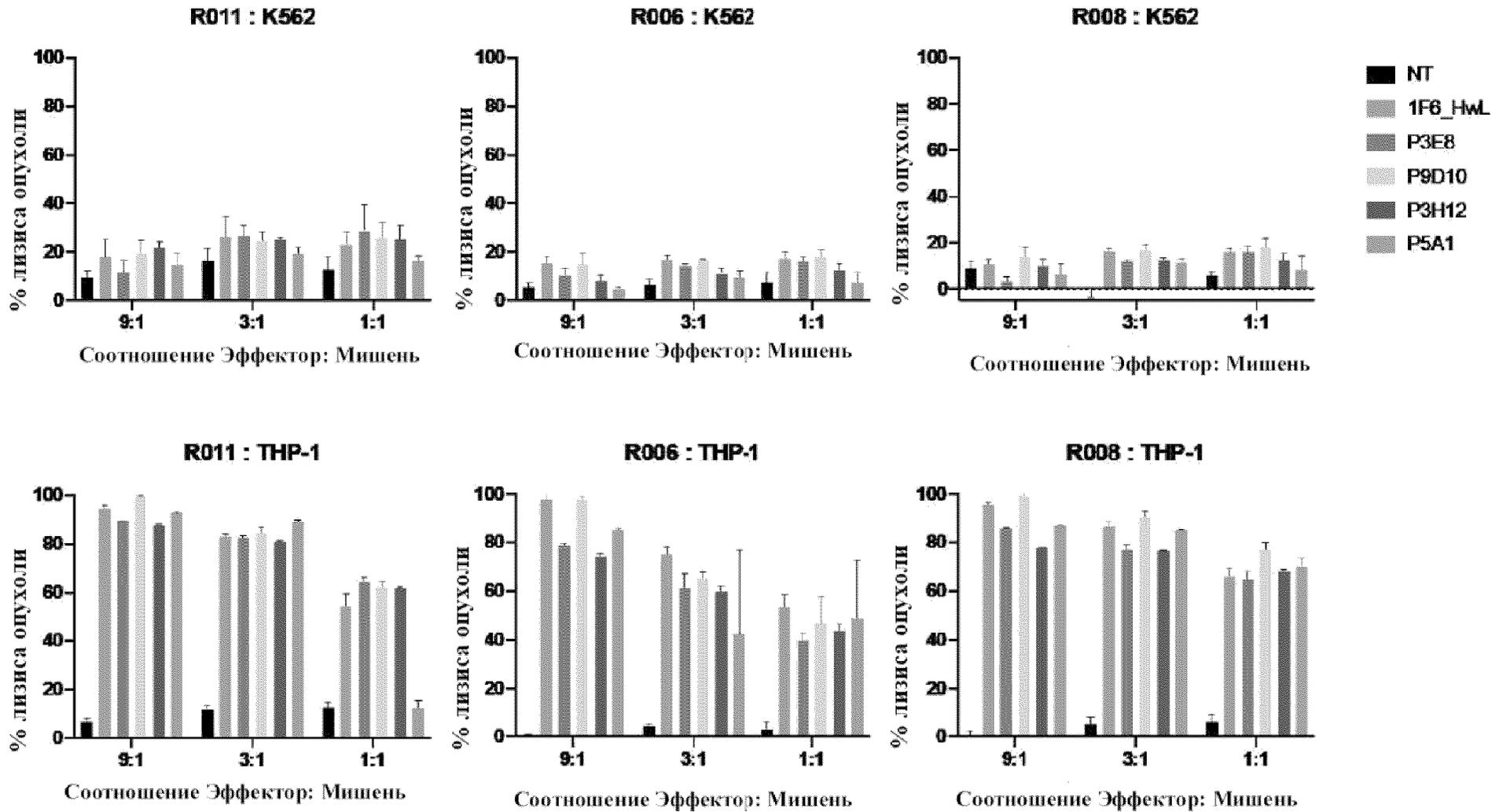
21/118

\* Отображает TCR-

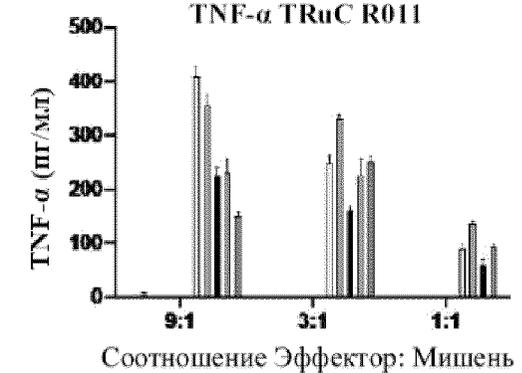
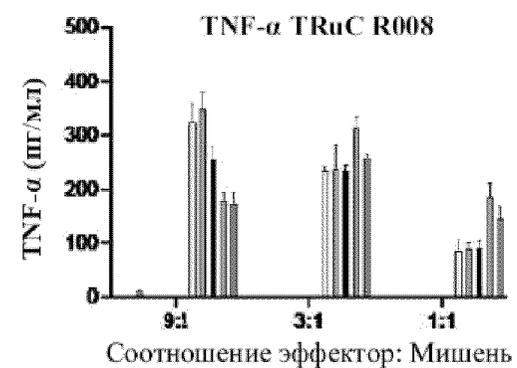
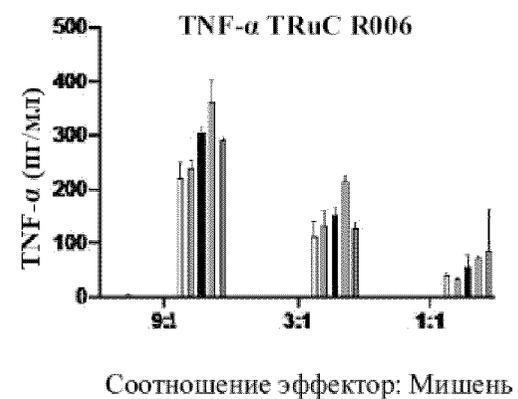
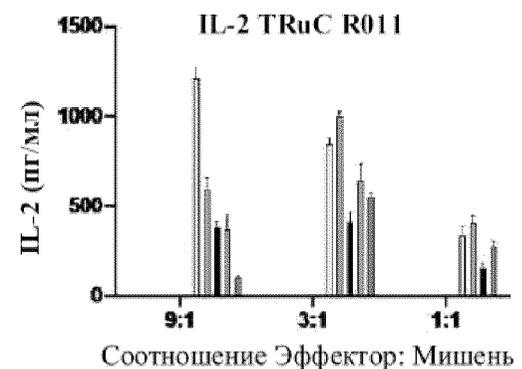
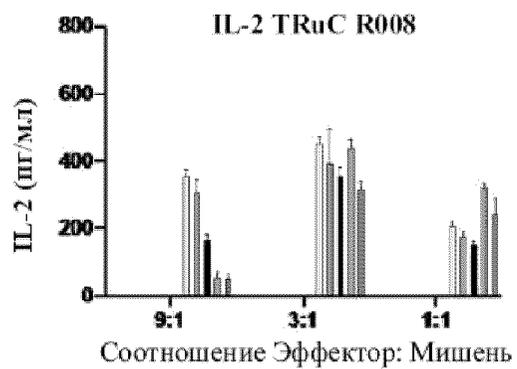
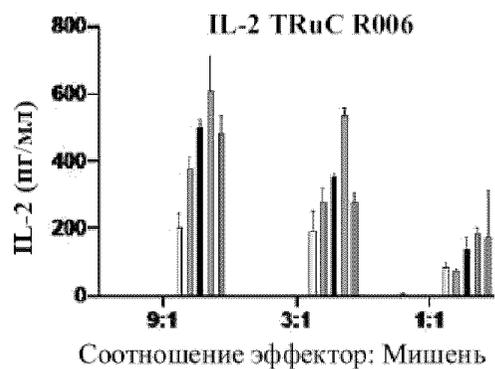
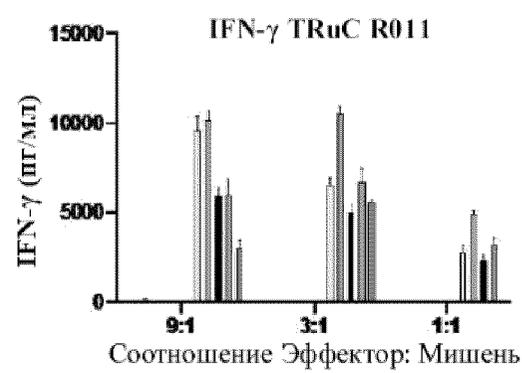
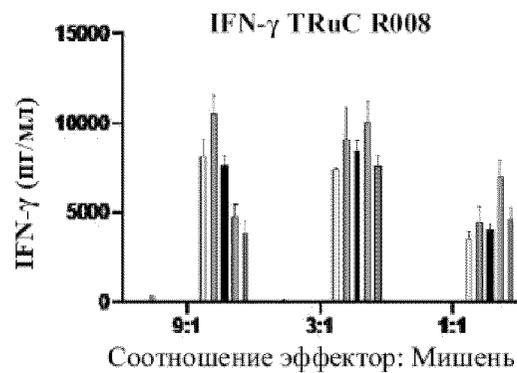
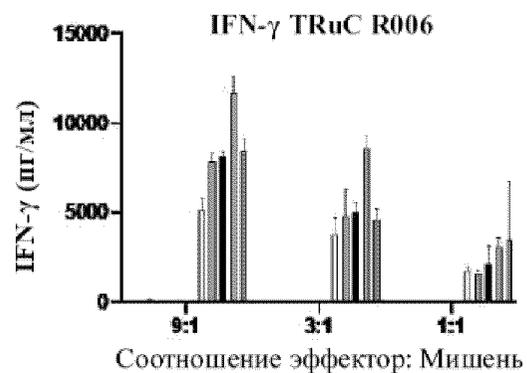
ФИГ. 9D



ФИГ. 10



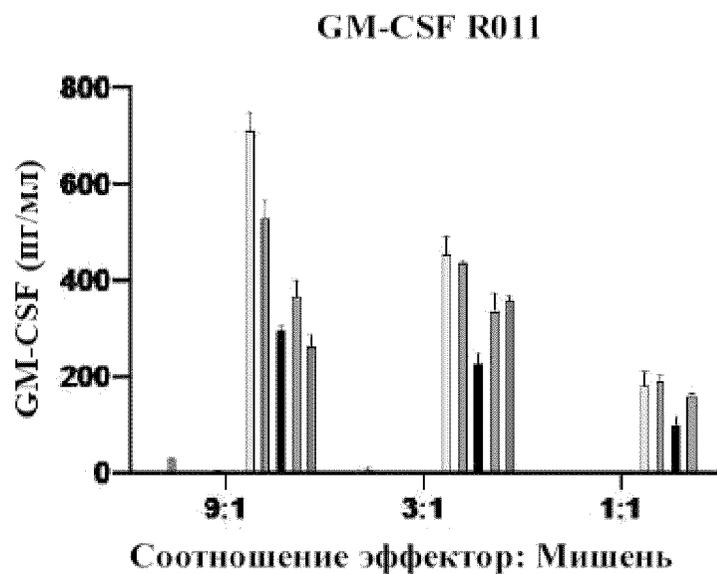
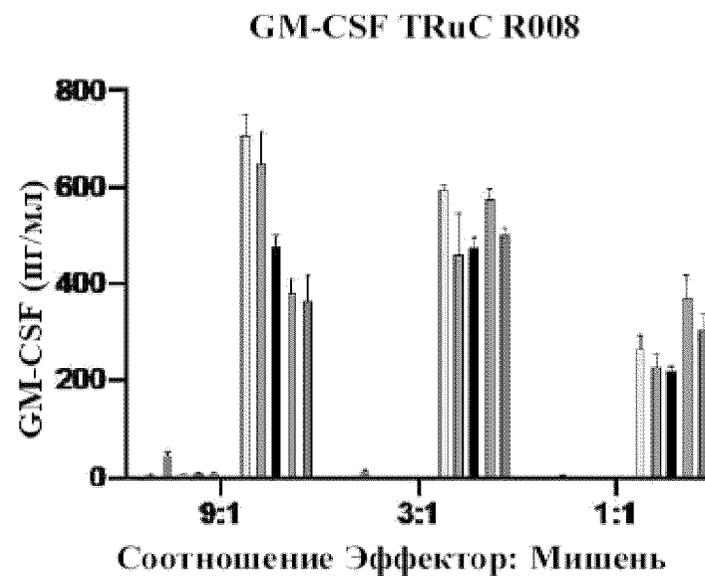
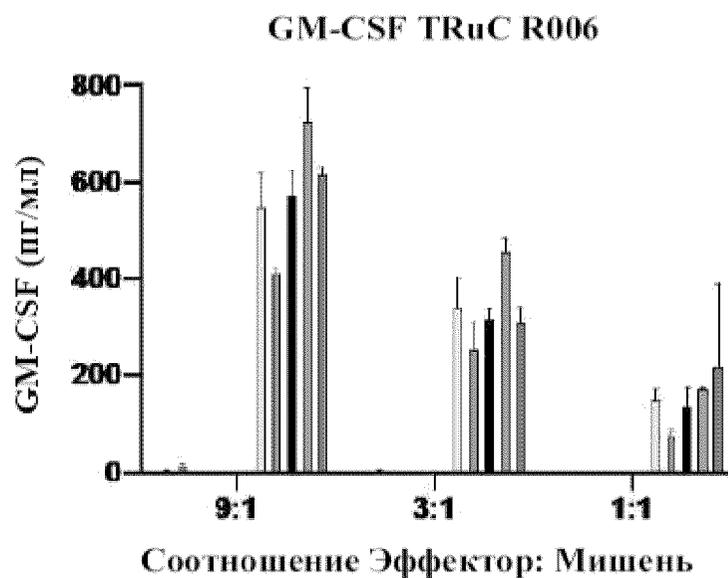
ФИГ. 11



- K562 + NT
- K562 + 1F6\_HwL
- K562 + R3aP3E8
- K562 + R3aP9D10
- K562 + R3P3H12
- K562 + R3P5A1
- THP-1 + NT
- THP-1 + 1F6\_HwL
- THP-1 + R3aP3E8
- THP-1 + R3aP9D10
- THP-1 + R3P3H12
- THP-1 + R3P5A1

24/118

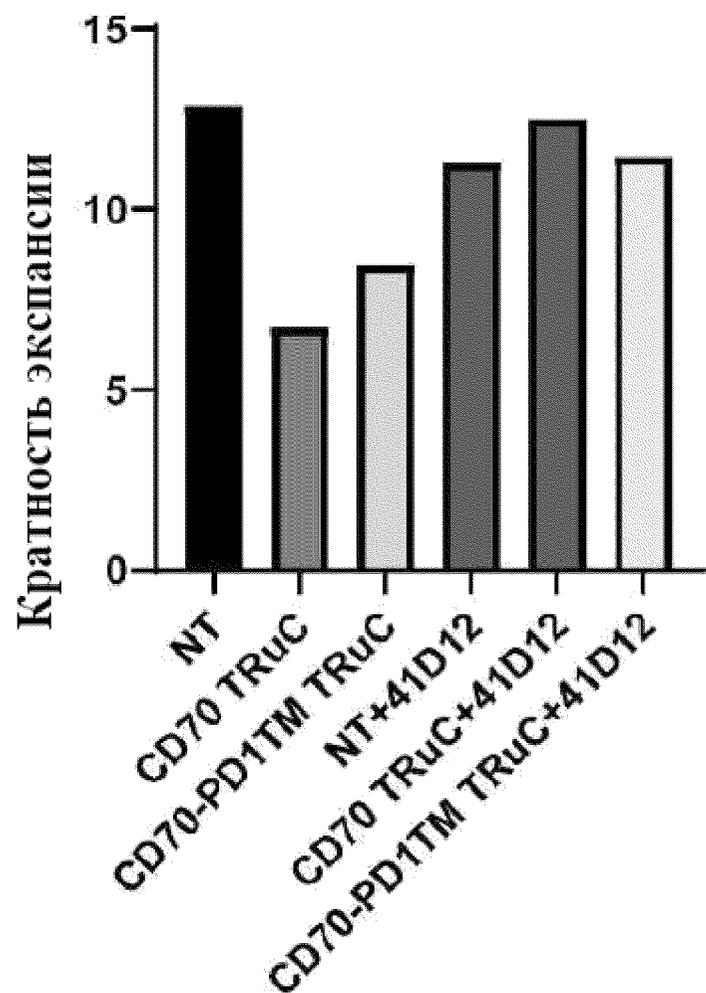
ФИГ. 12А



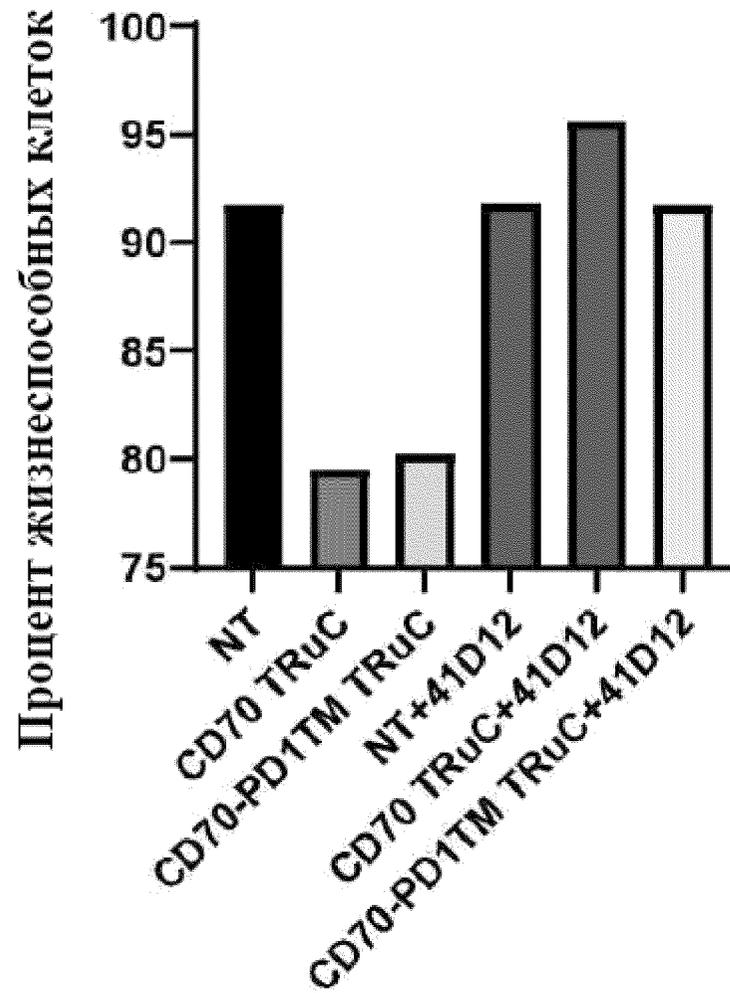
- K562 + NT
- K562 + 1F6\_HwL
- K562 + R3aP3E8
- K562 + R3aP9D10
- K562 + R3P3H12
- K562 + R3P5A1
- THP-1 + NT
- THP-1 + 1F6\_HwL
- THP-1 + R3aP3E8
- THP-1 + R3aP9D10
- THP-1 + R3P3H12
- THP-1 + R3P5A1

**ФИГ. 12В**

Кратность экспансии на 10 день

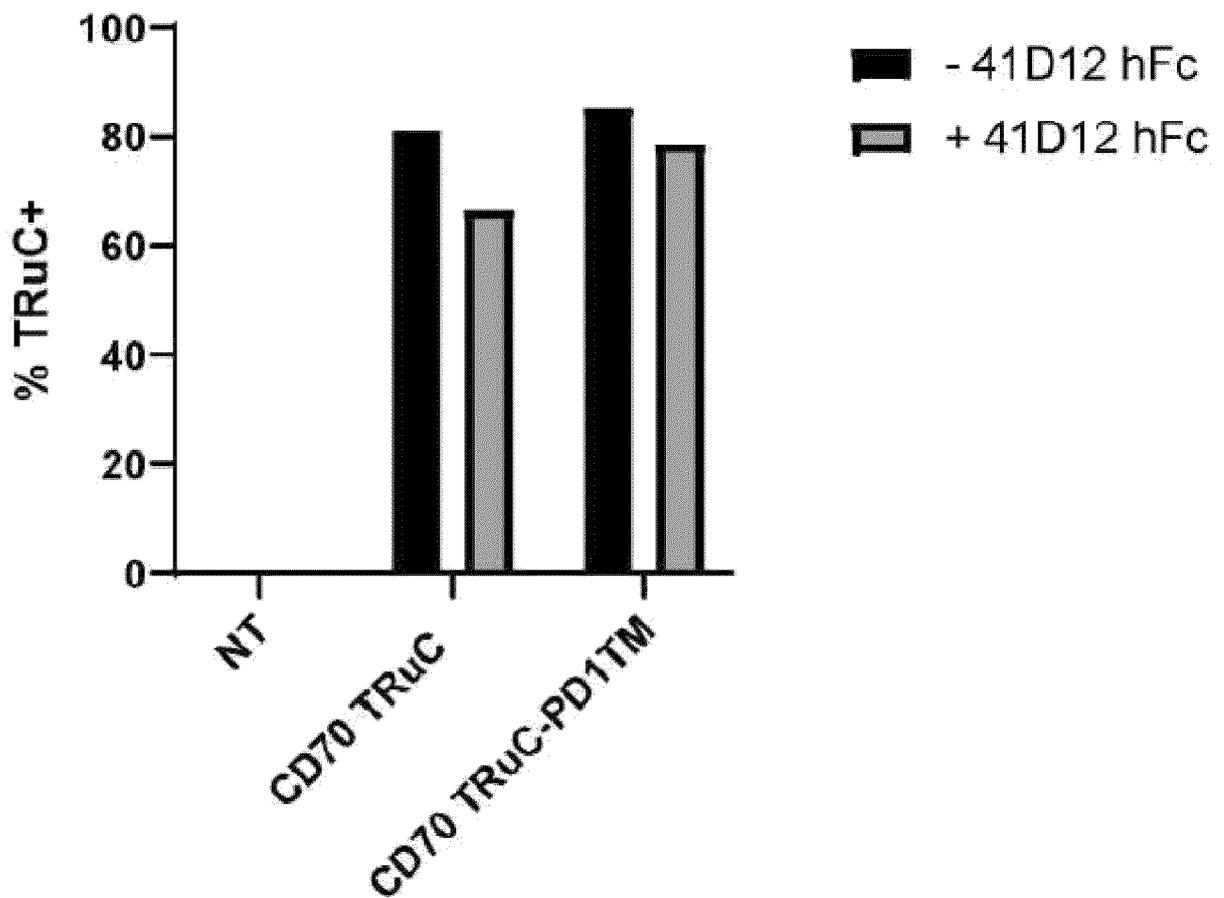


Жизнеспособность на 10 день

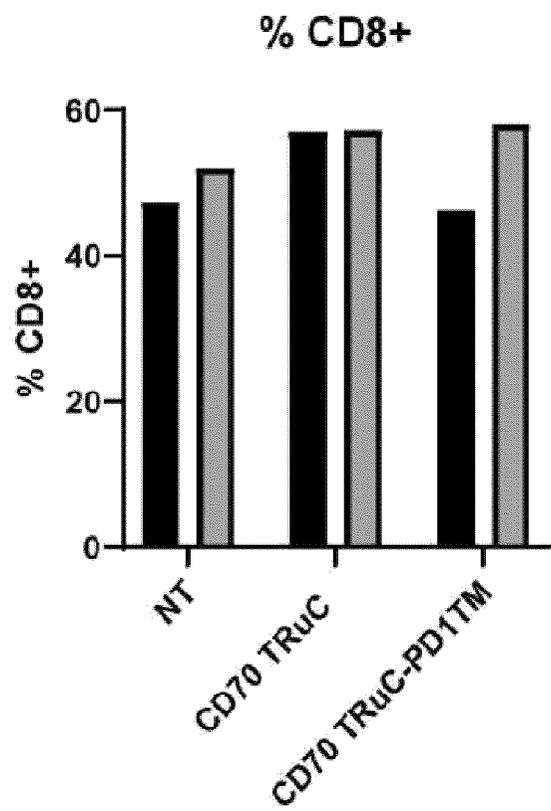
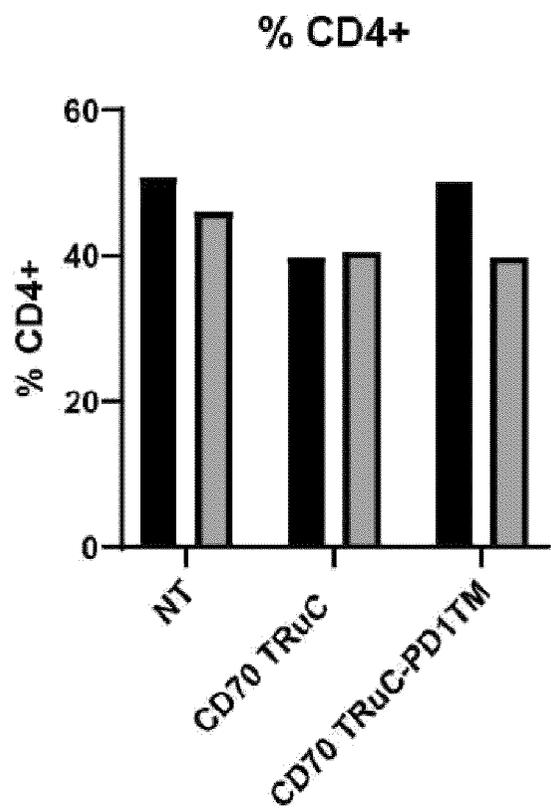


ФИГ. 13

## Эффективность трансдукции



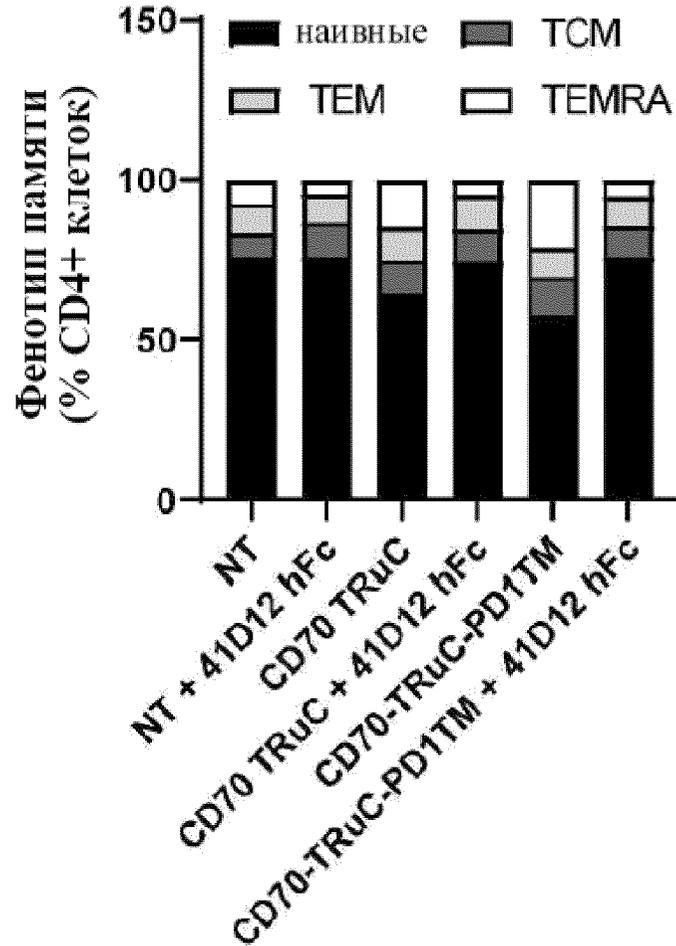
ФИГ. 14



ФИГ. 15

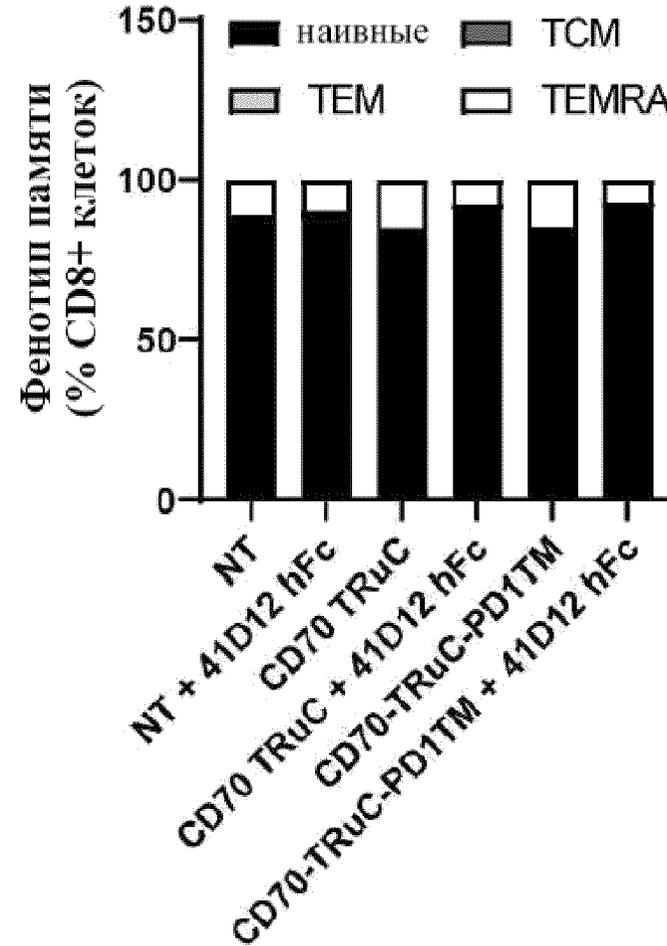
# Фенотип памяти

Определение фенотипа CD4+ памяти



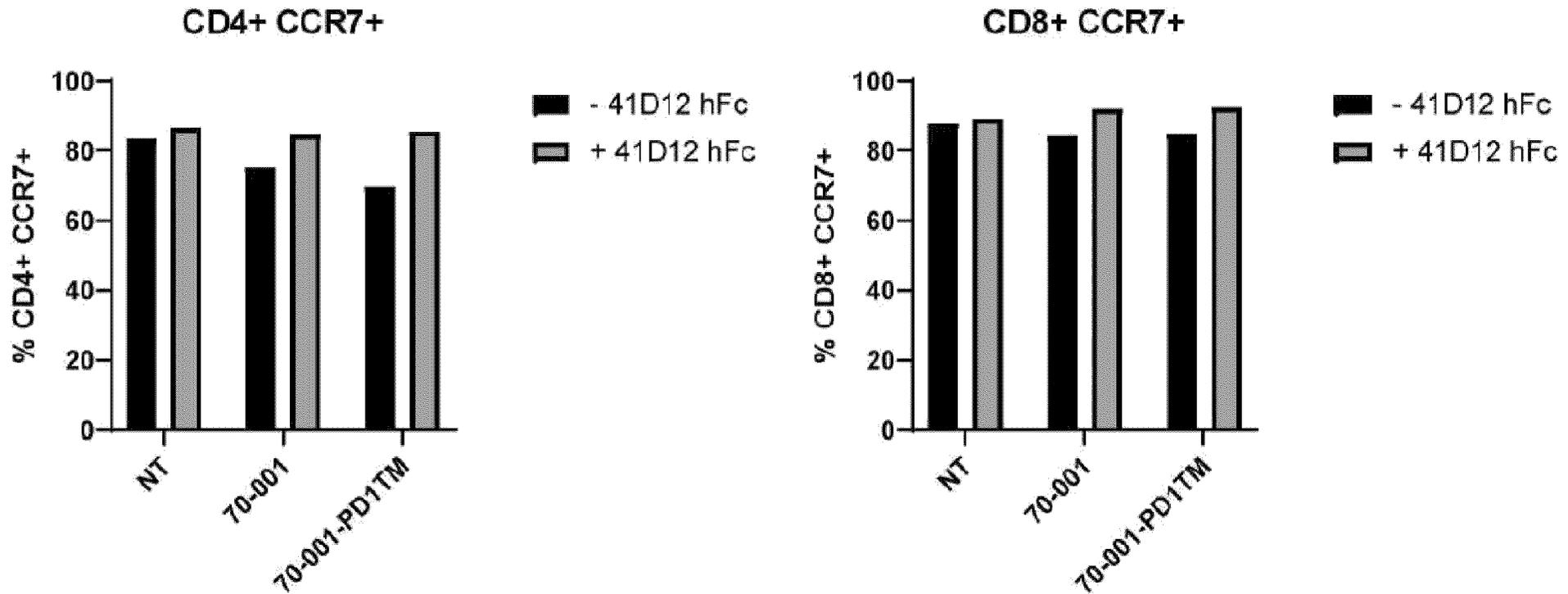
ФИГ. 16А

Определение фенотипа CD8+ памяти

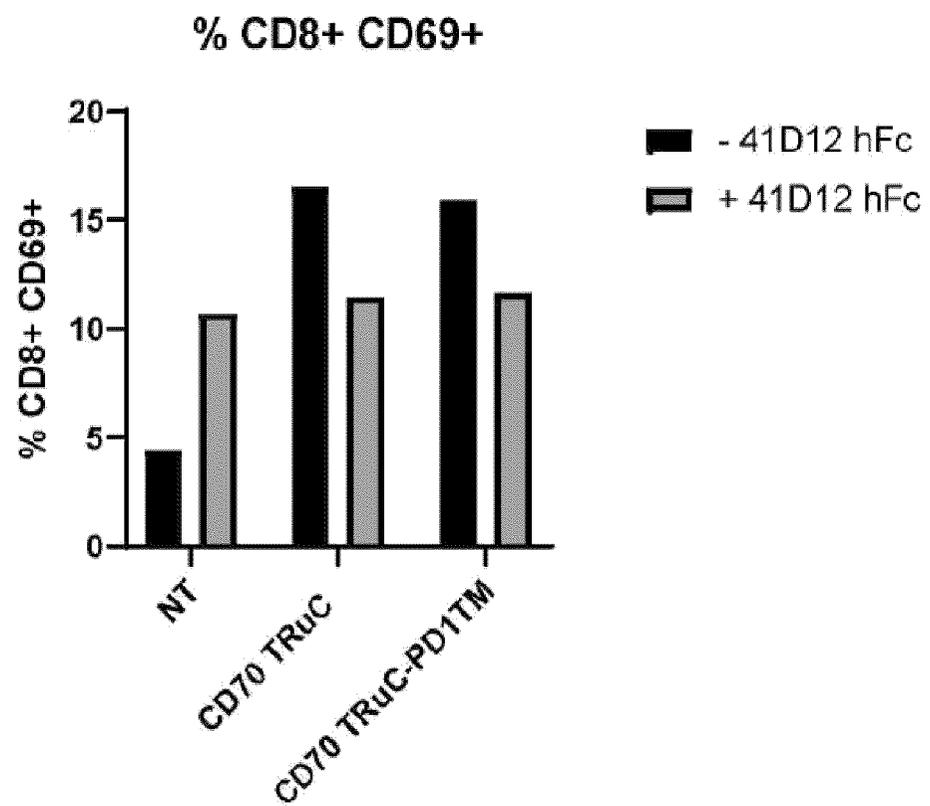
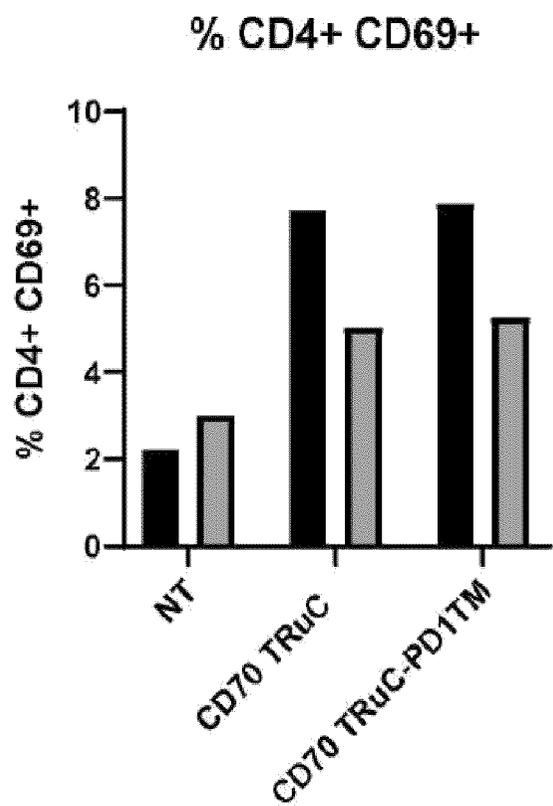


ФИГ. 16В

# Экспрессия CCR7

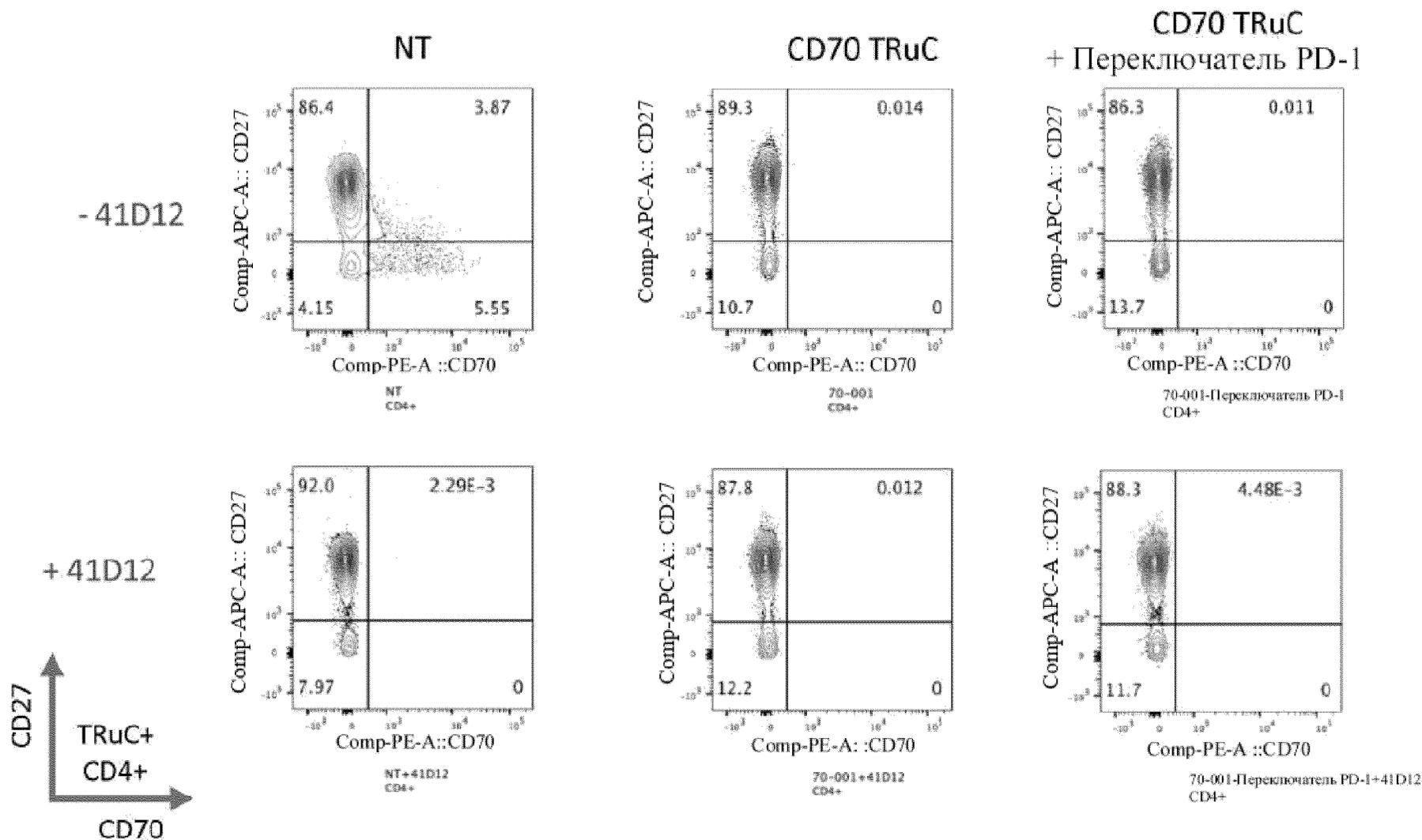


ФИГ. 17



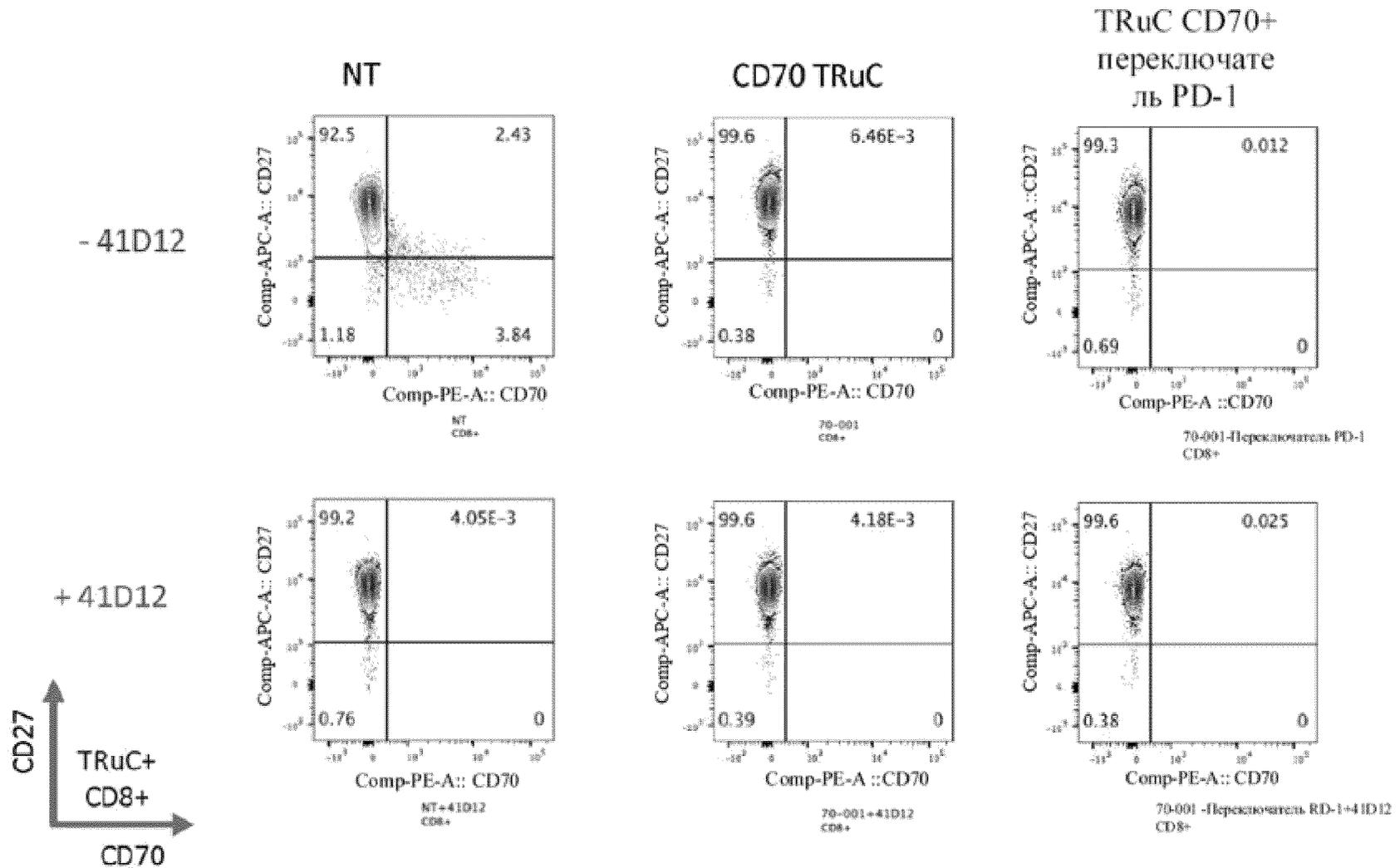
ФИГ. 18

# Блокирование CD70 CD4+ CD70 по сравнению с CD27 - 41D12

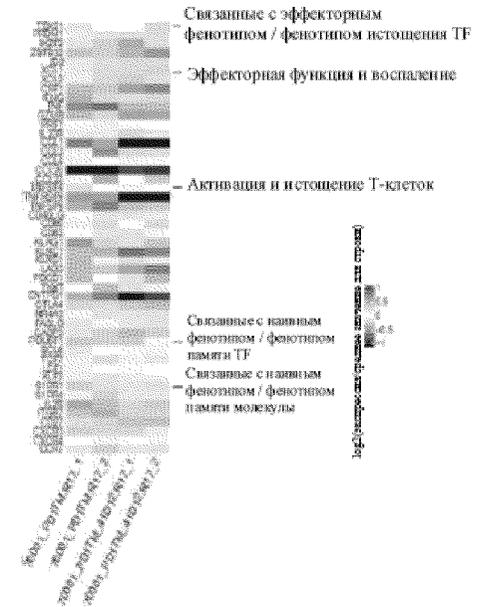
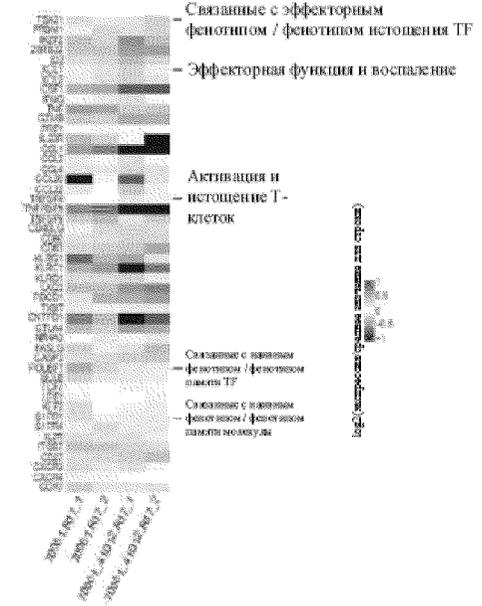
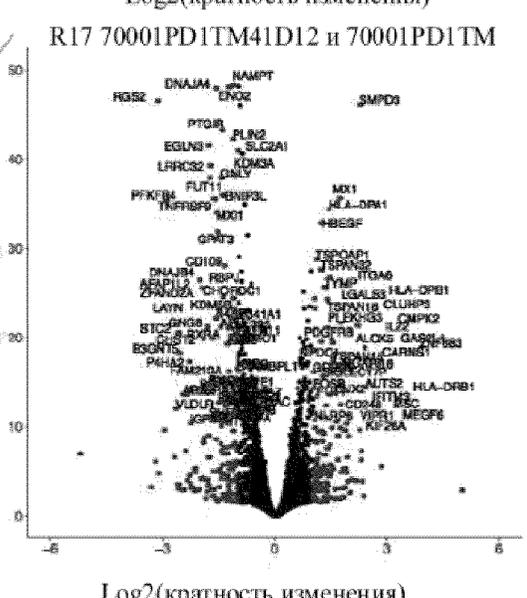
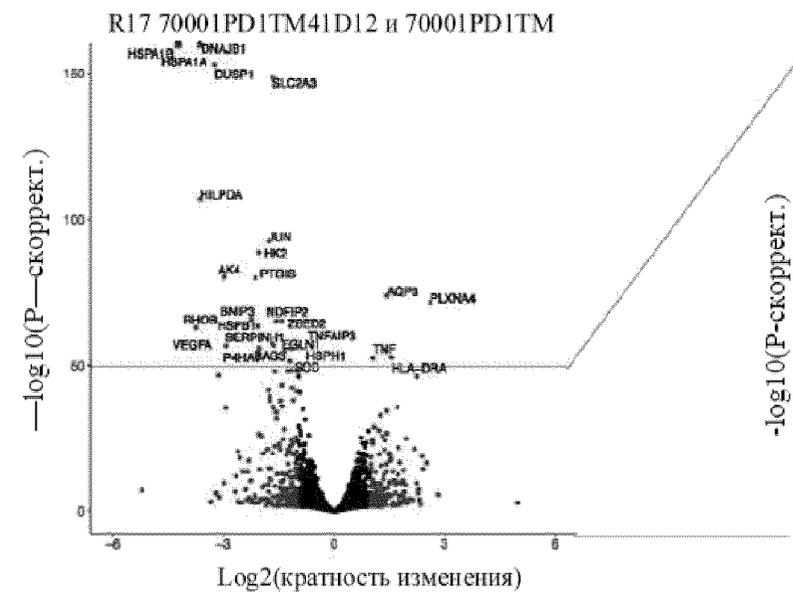
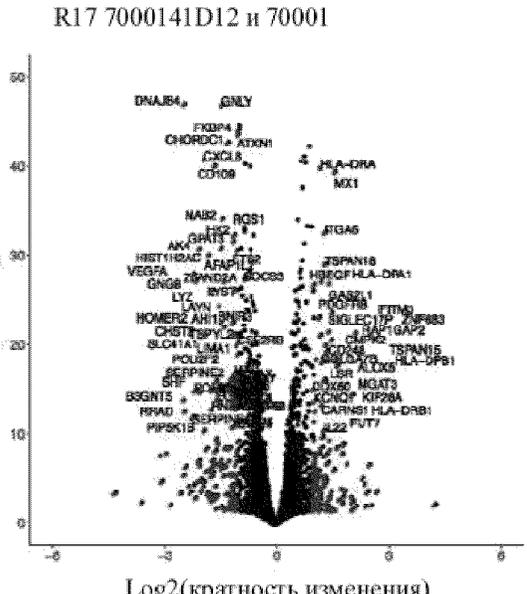
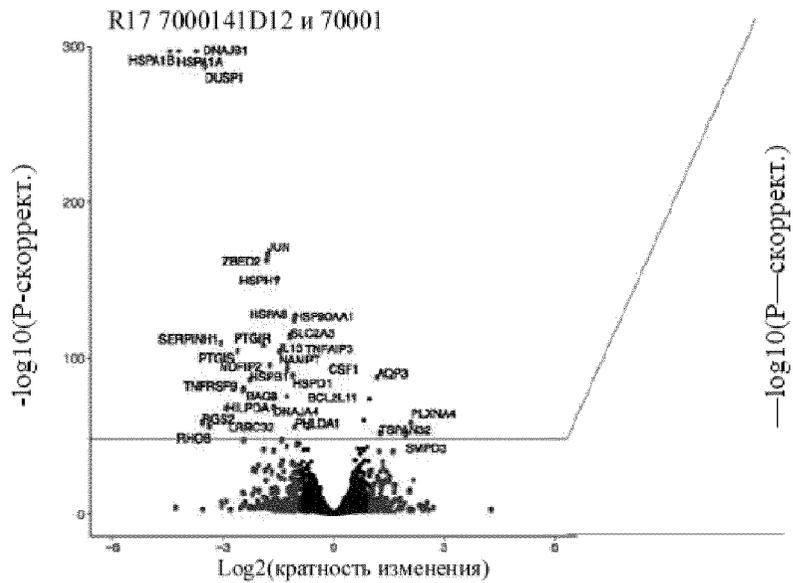


ФИГ. 19А

# CD8+ CD70 и CD27

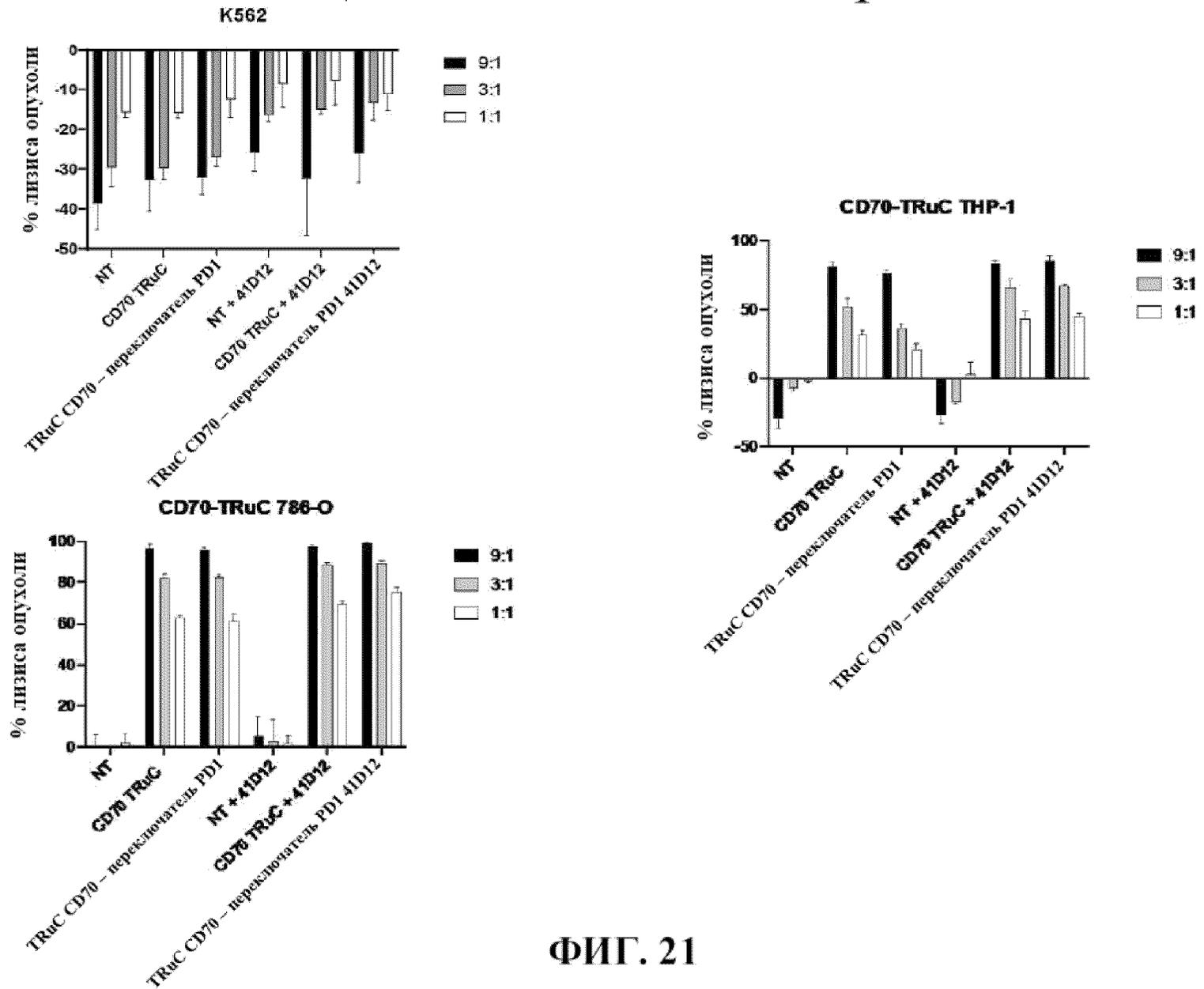


ФИГ. 19В



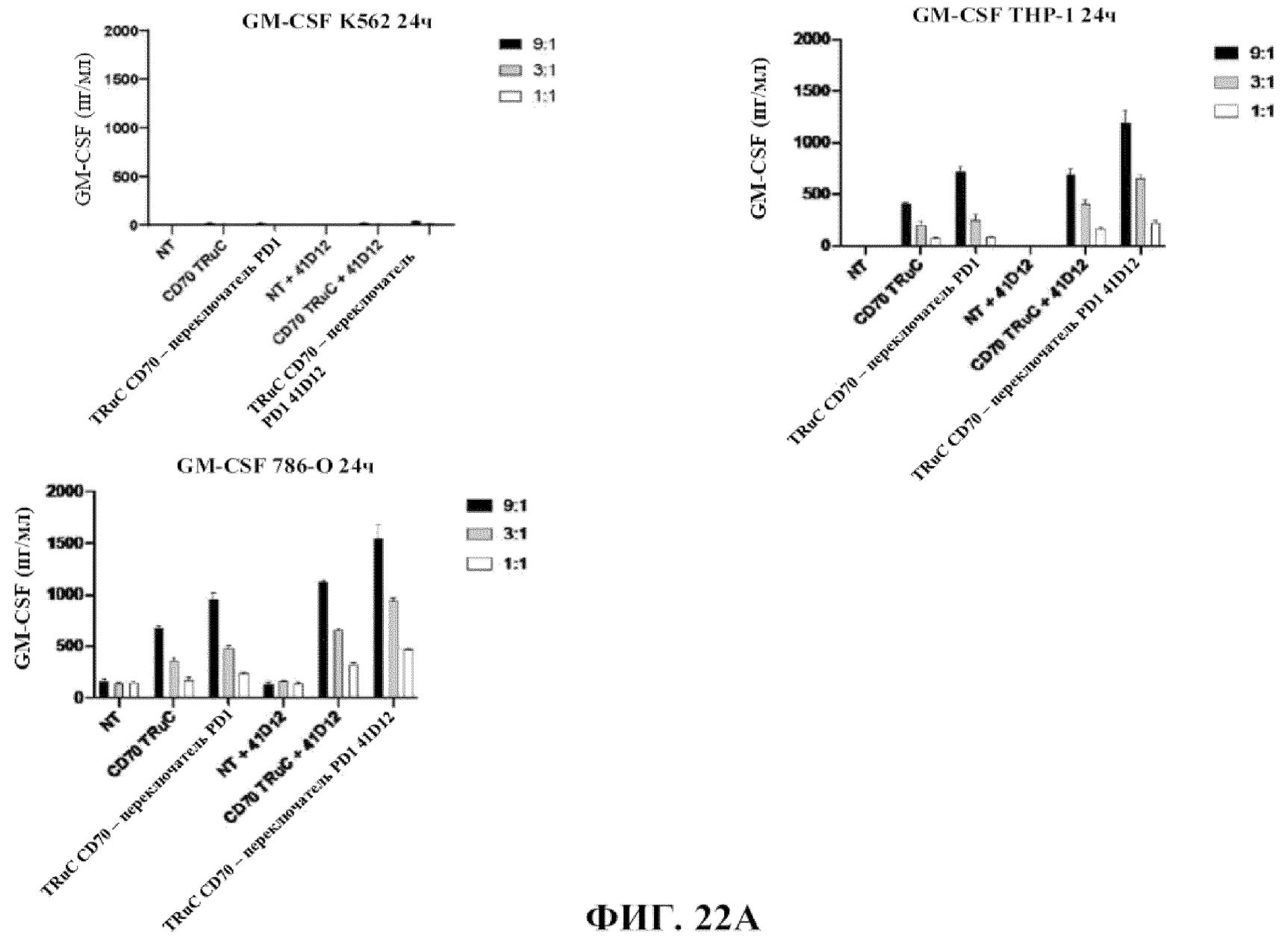
ФИГ. 20

# Цитотоксичность через 24 ч



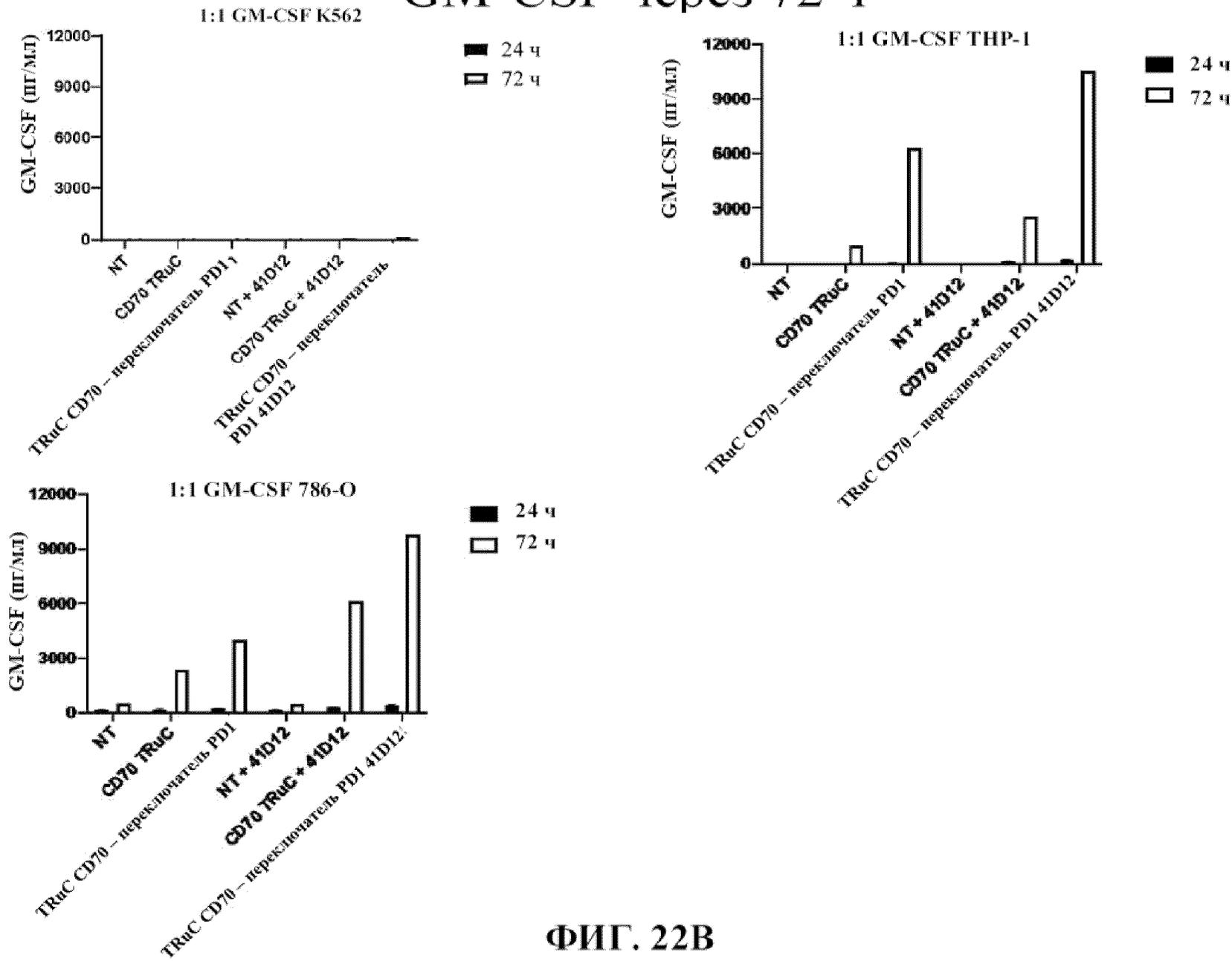
ФИГ. 21

# GM-CSF через 24 ч



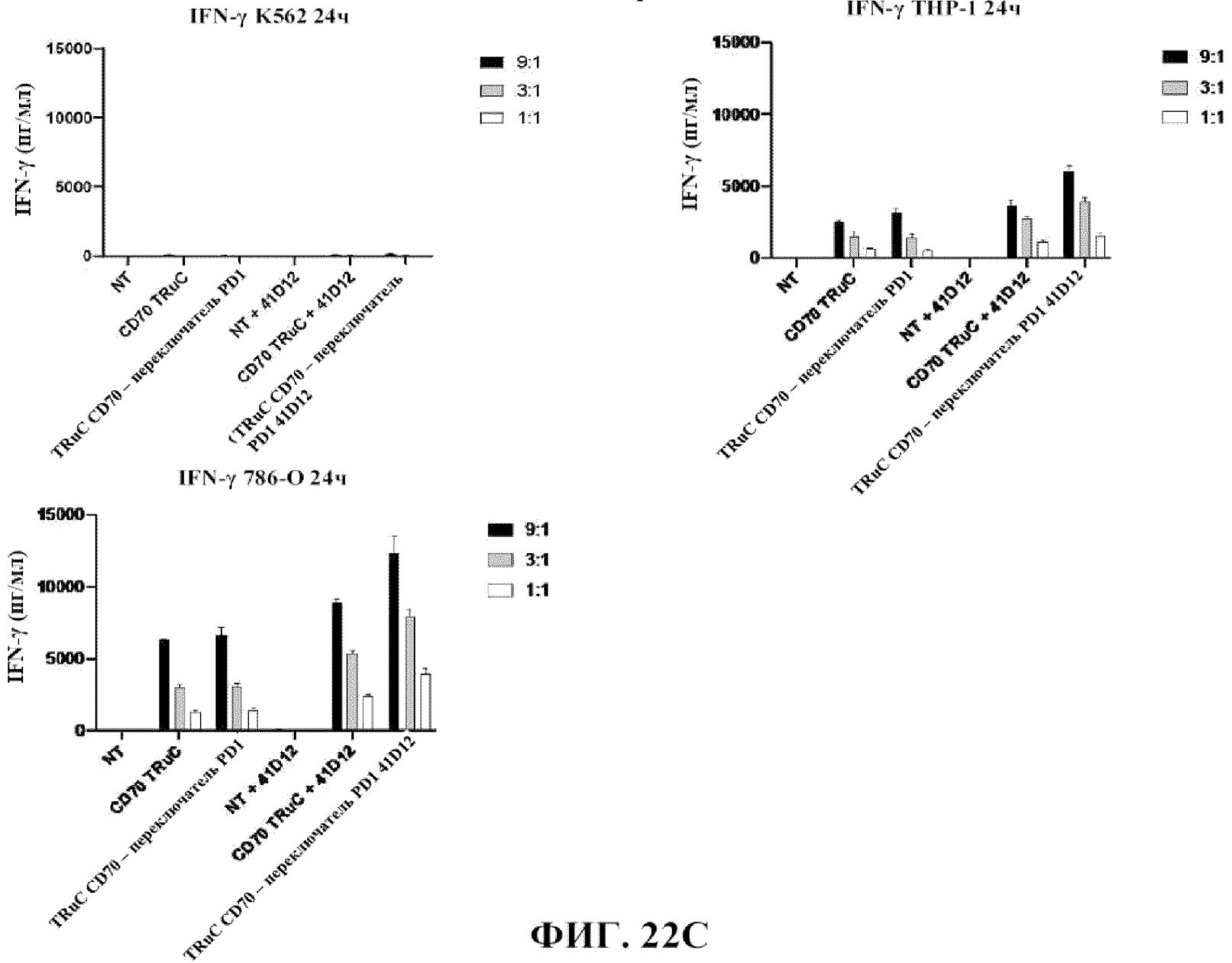
ФИГ. 22А

# GM-CSF через 72 ч



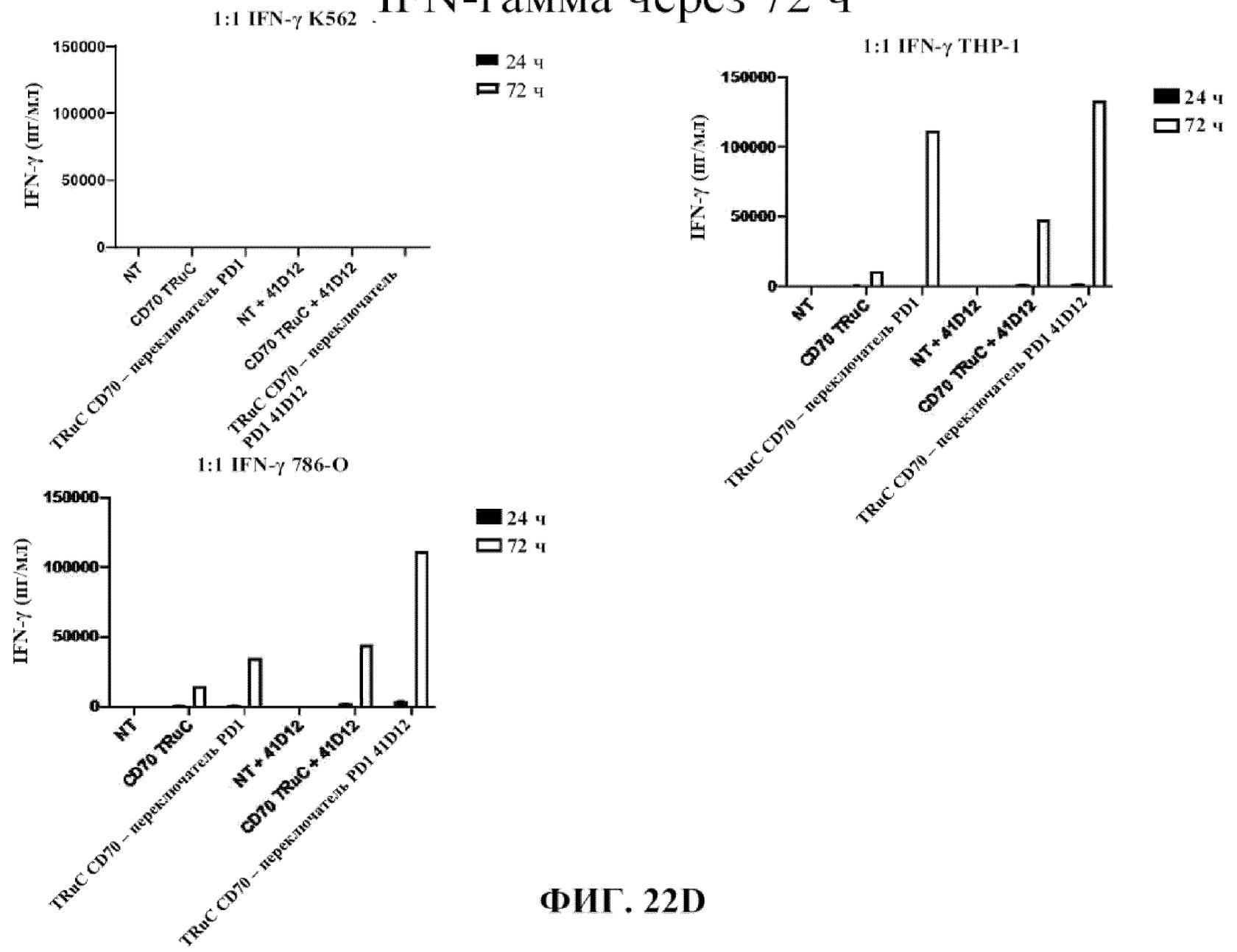
ФИГ. 22В

# IFN-гамма через 24 ч

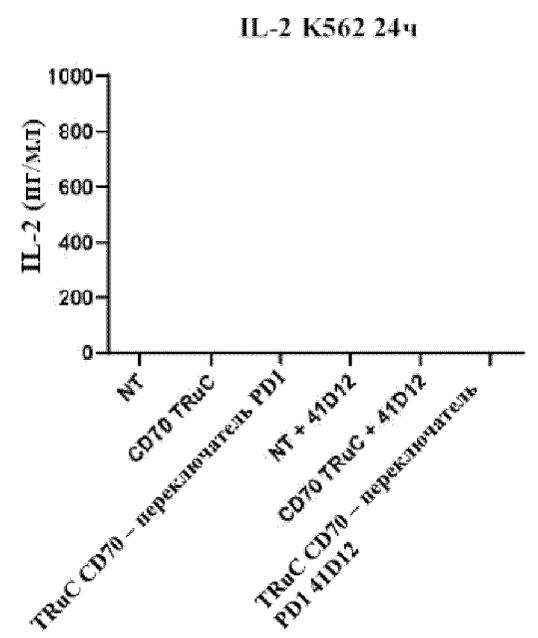


ФИГ. 22С

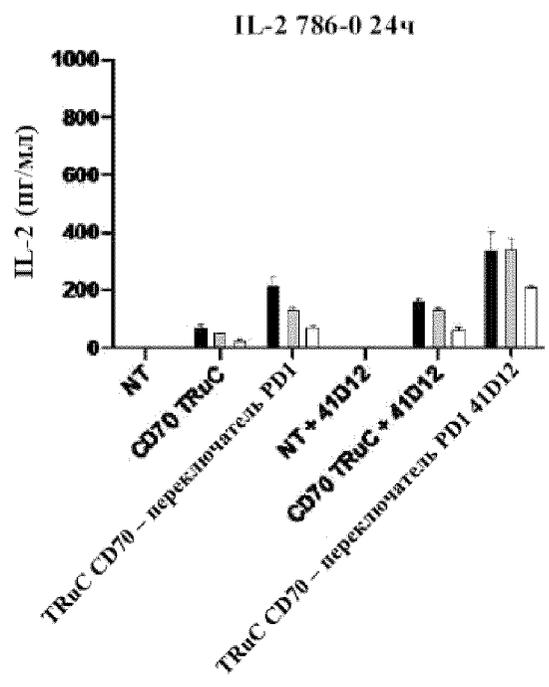
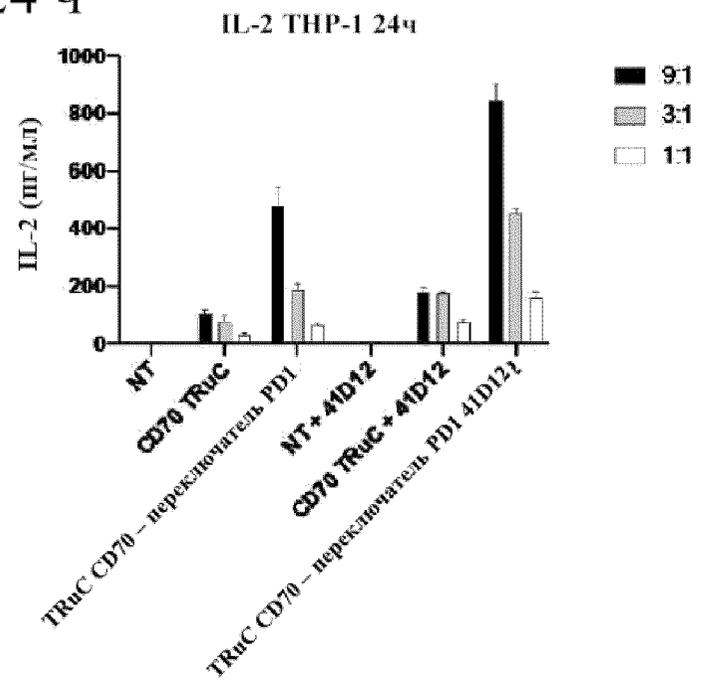
# IFN-гамма через 72 ч



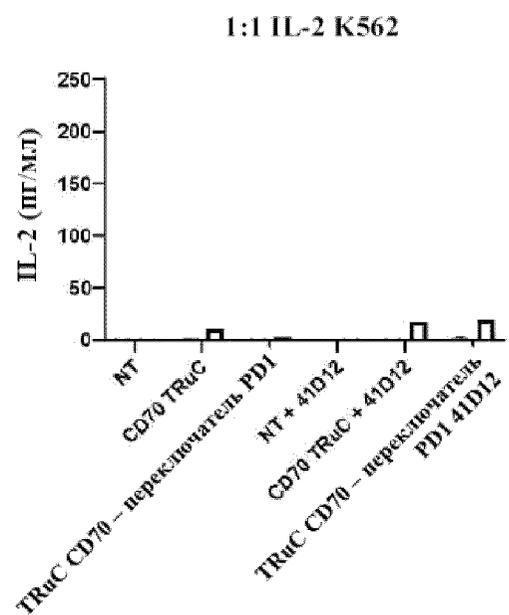
ФИГ. 22D



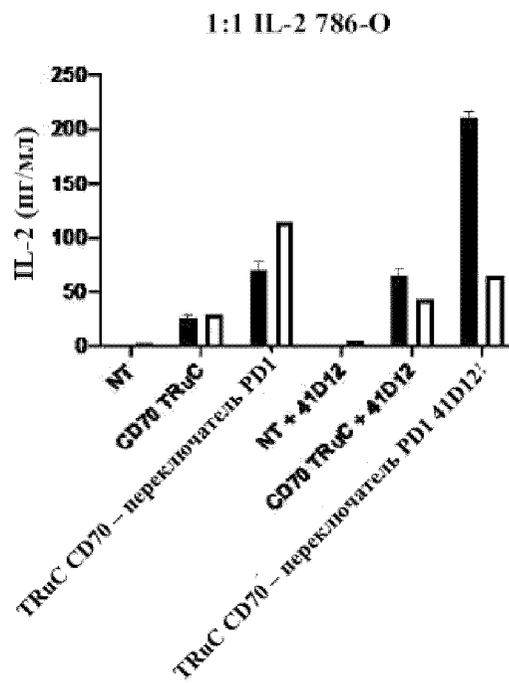
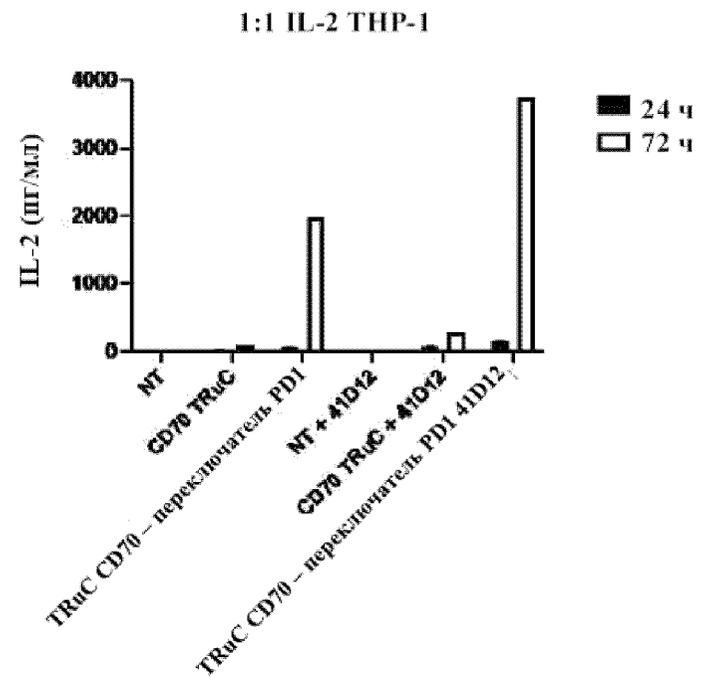
IL-2 через 24 ч



ФИГ. 22Е



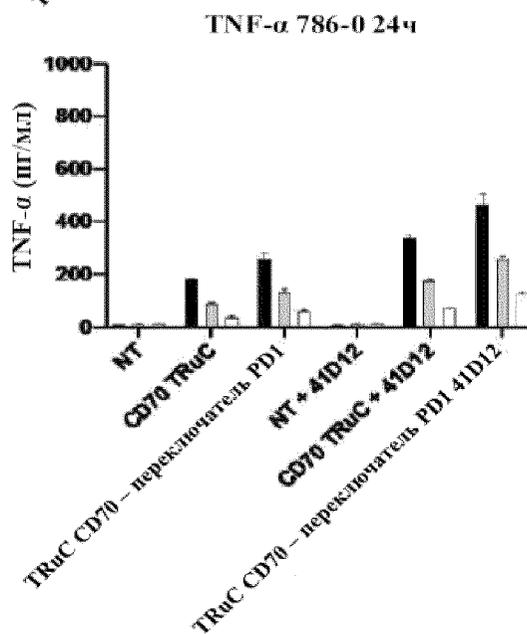
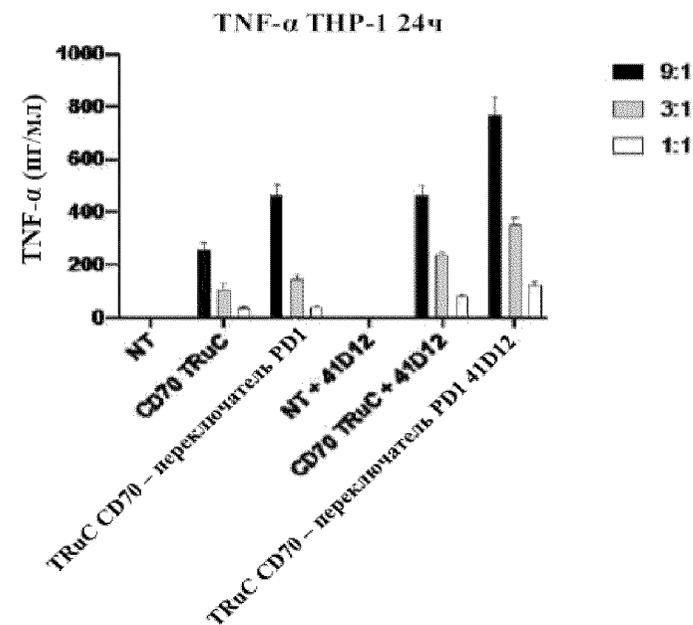
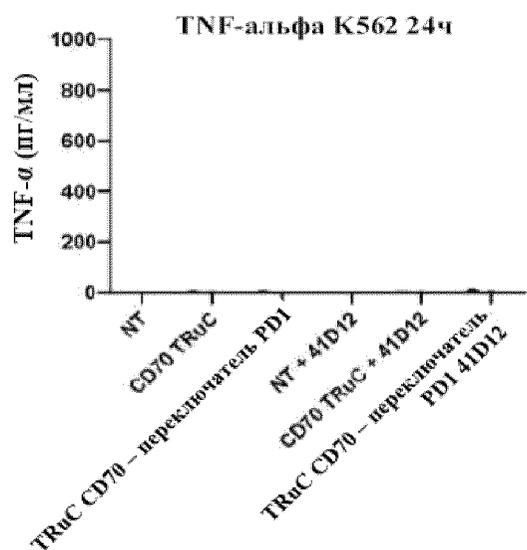
IL-2 через 72 ч



11/118

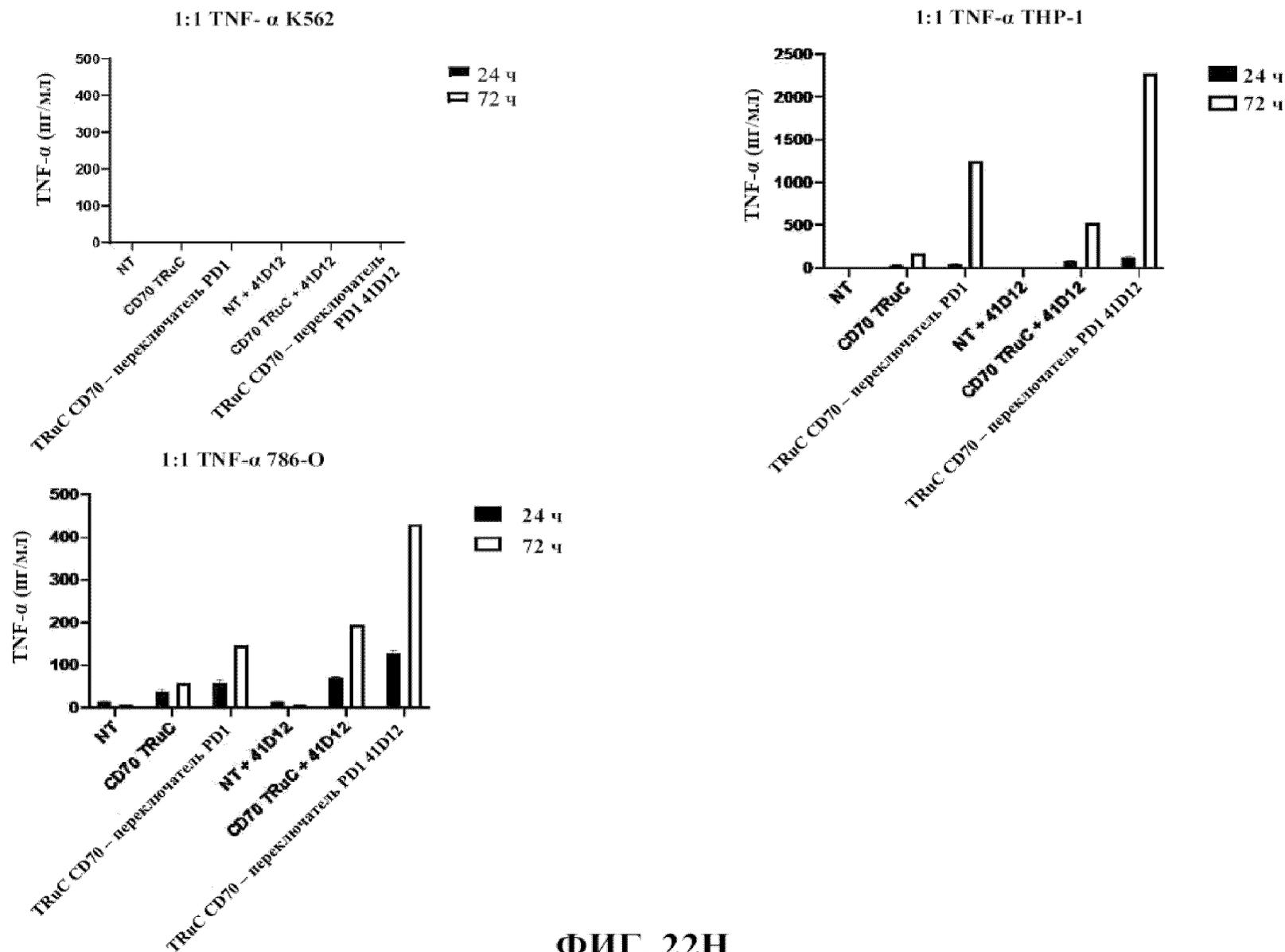
ФИГ. 22F

# TNF- альфа через 24 ч



ФИГ. 22G

# TNF- альфа через 72 ч



ФИГ. 22H

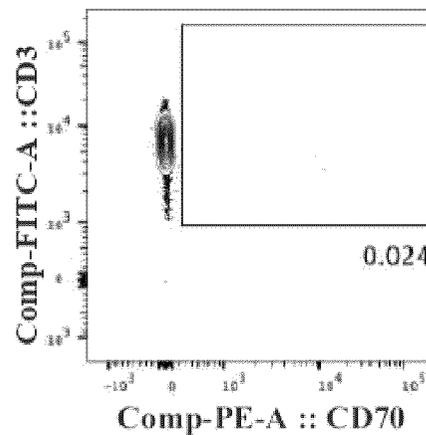
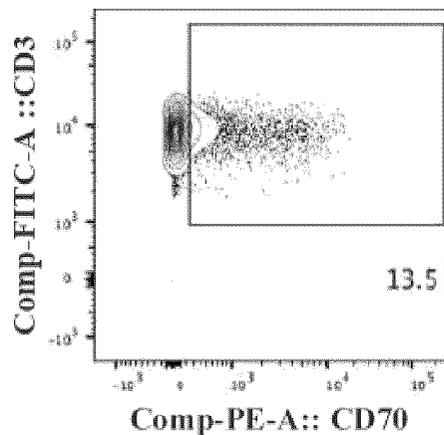
ФИГ. 23А

# CD70 CRISPR KO TRuC -7 день CD70 и CD3

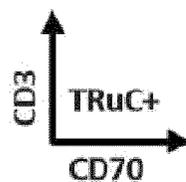
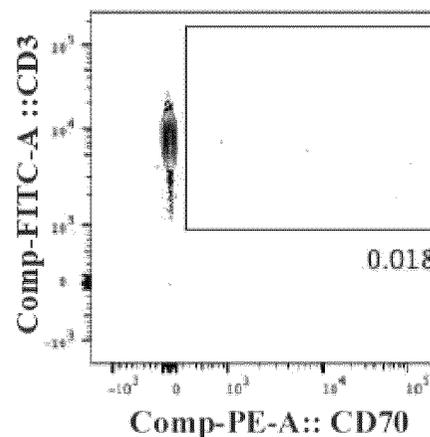
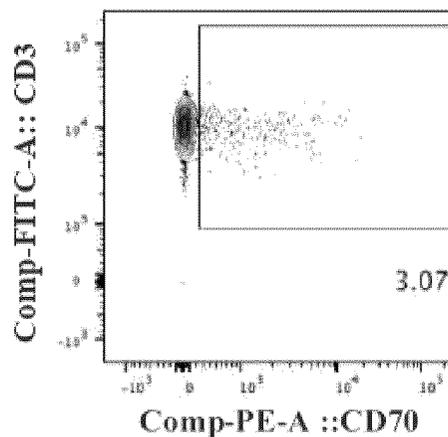
NT

CD70 TRuC

Неотредактированные



Отредактированные



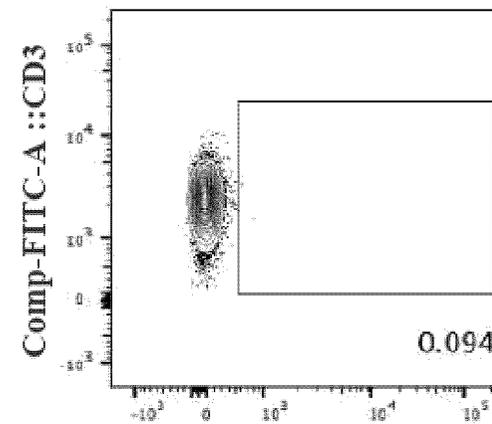
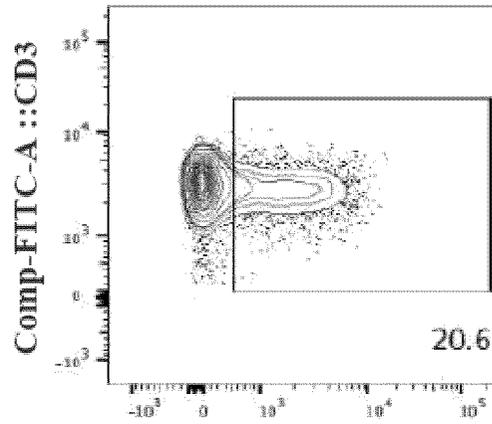
ФИГ. 23В

# CD70 CRISPR KO TRuC - 9 день CD70 и CD3

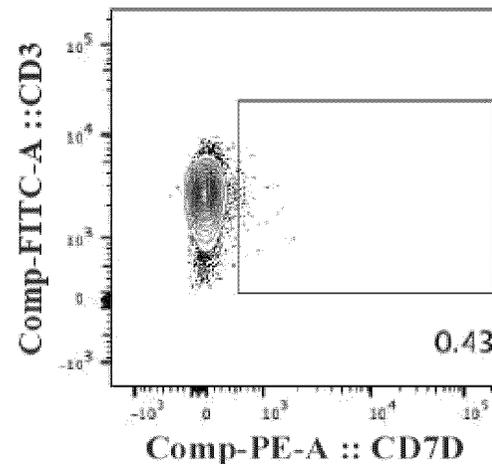
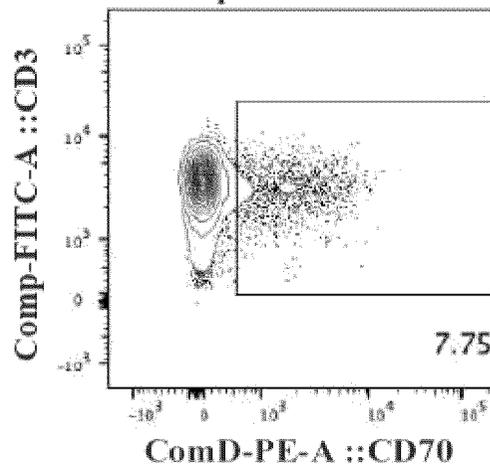
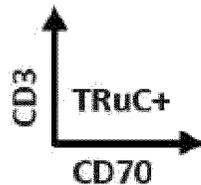
Неотредактированные

NT

CD70 TRuC

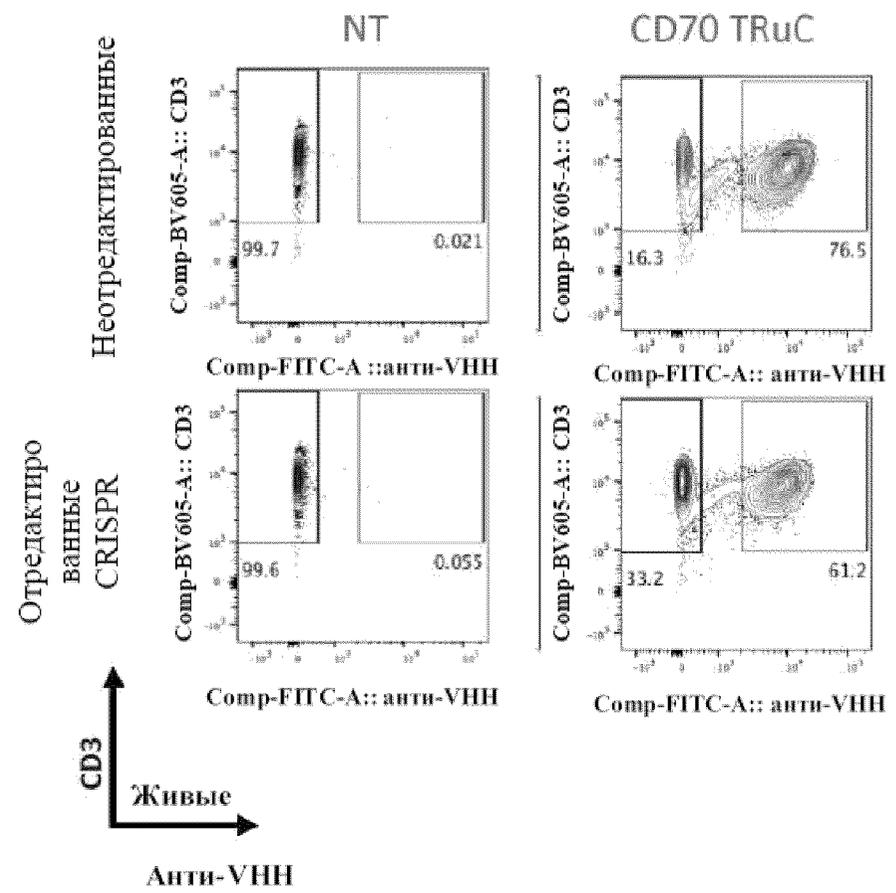


Отредактированные

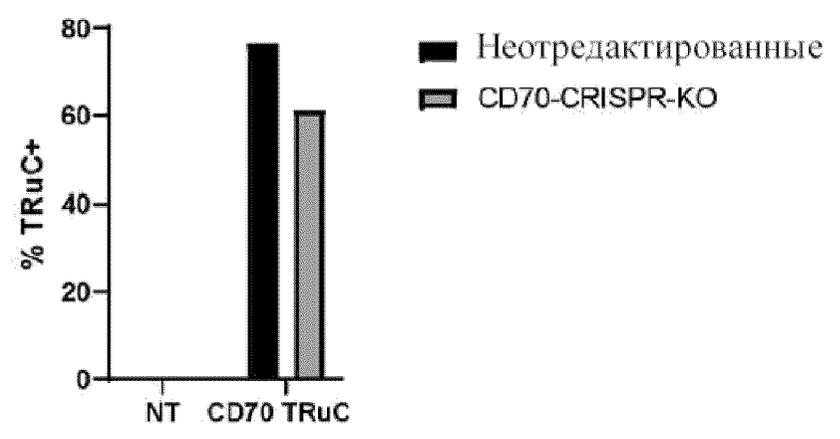


# Определение фенотипа TRuC на 10 день - донор R017

Анти-VHH и CD3



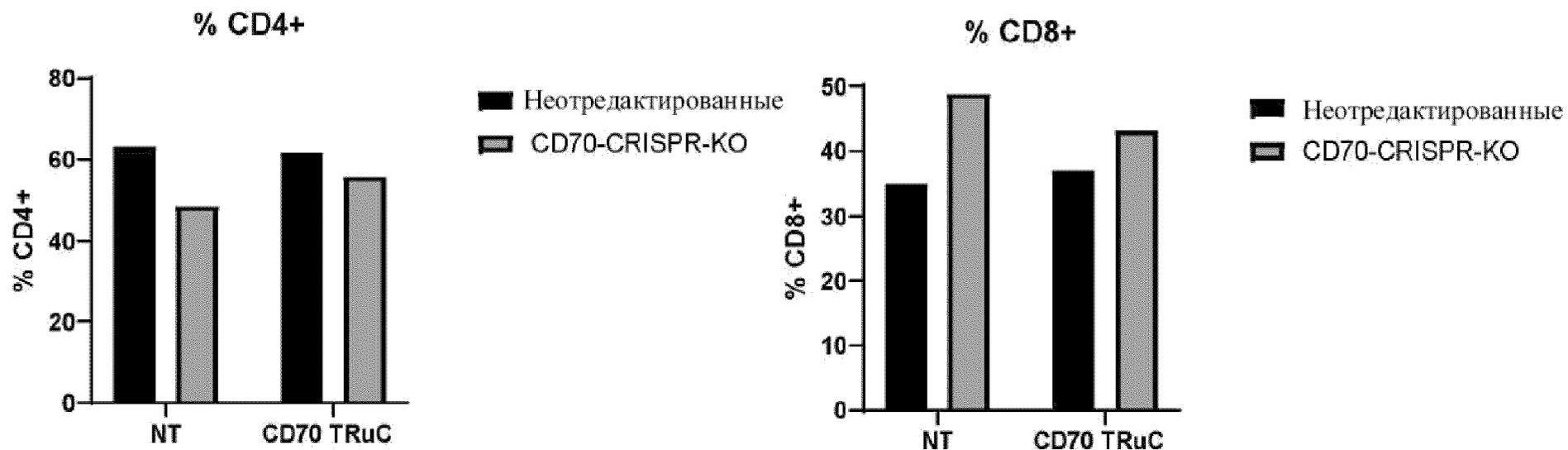
Эффективность трансдукции



46/118

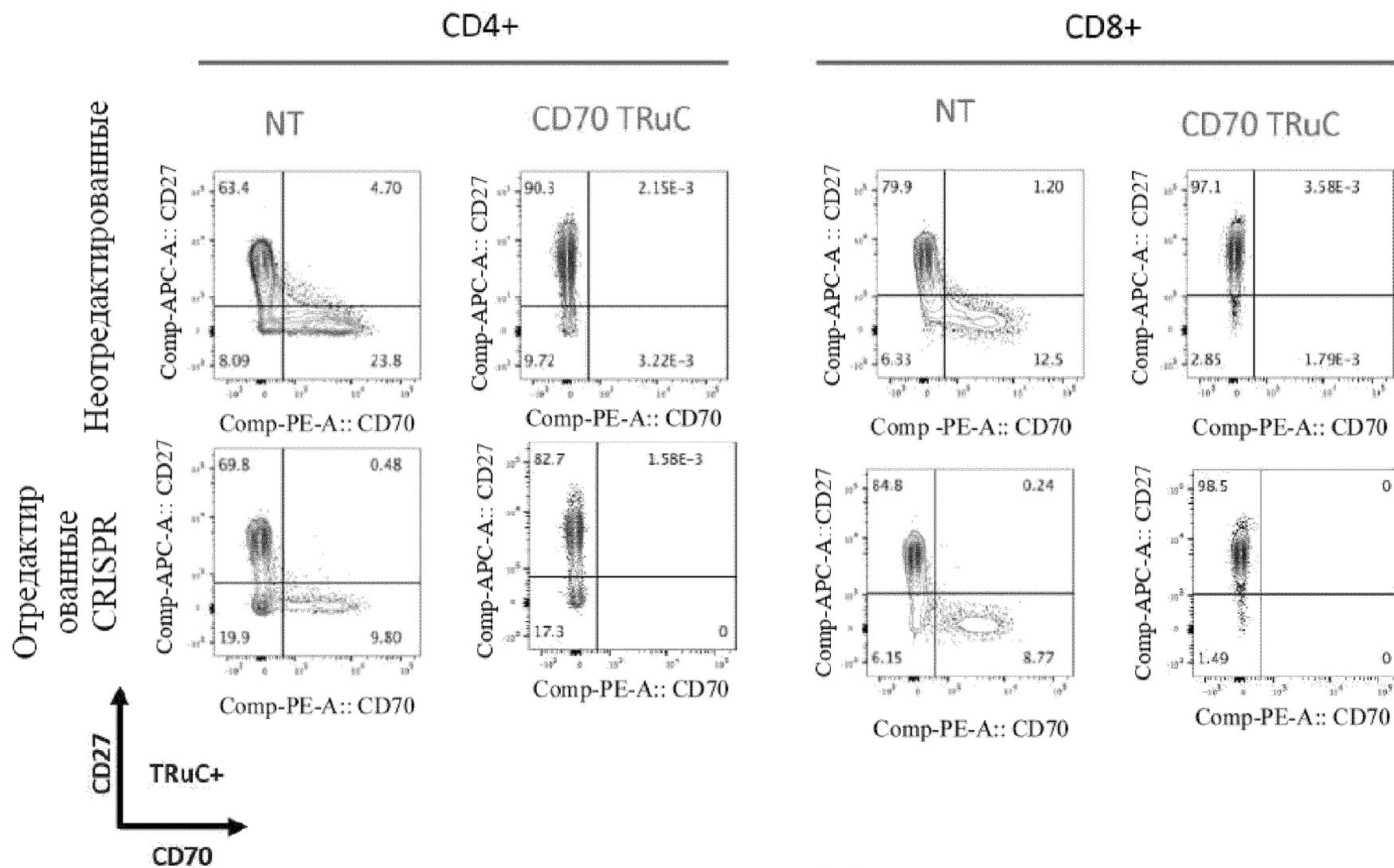
ФИГ. 24

# Определение фенотипа TRuC на 10 день - CD4+ и CD8+ Т-клеток



ФИГ. 25

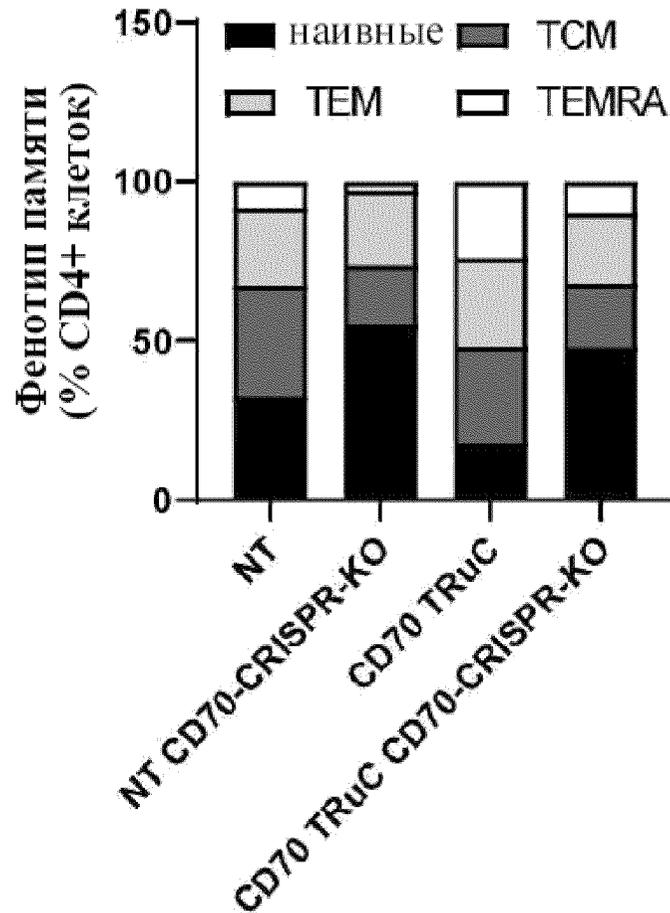
# Определение фенотипа TRuC на 10 день: CD70 и CD27



ФИГ. 26

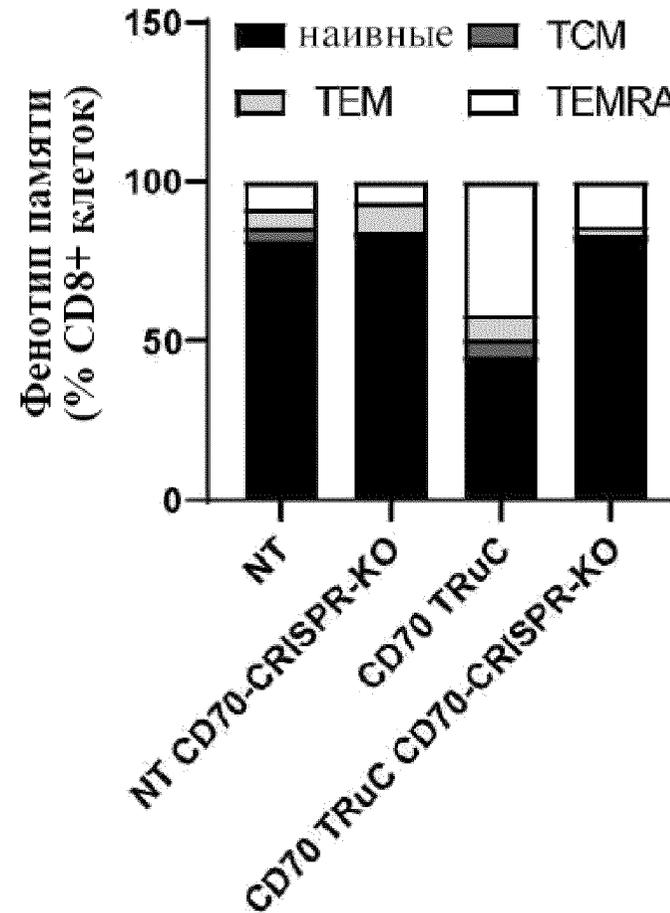
# Фенотип памяти

Определение фенотипа CD4+ памяти



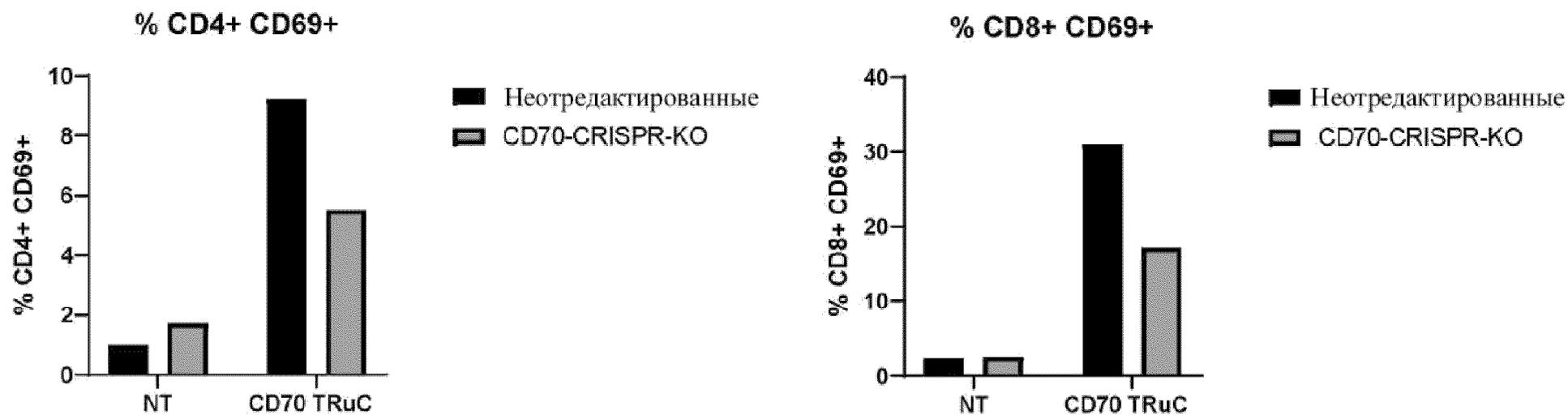
ФИГ. 27А

Определение фенотипа CD8+ памяти



ФИГ. 27В

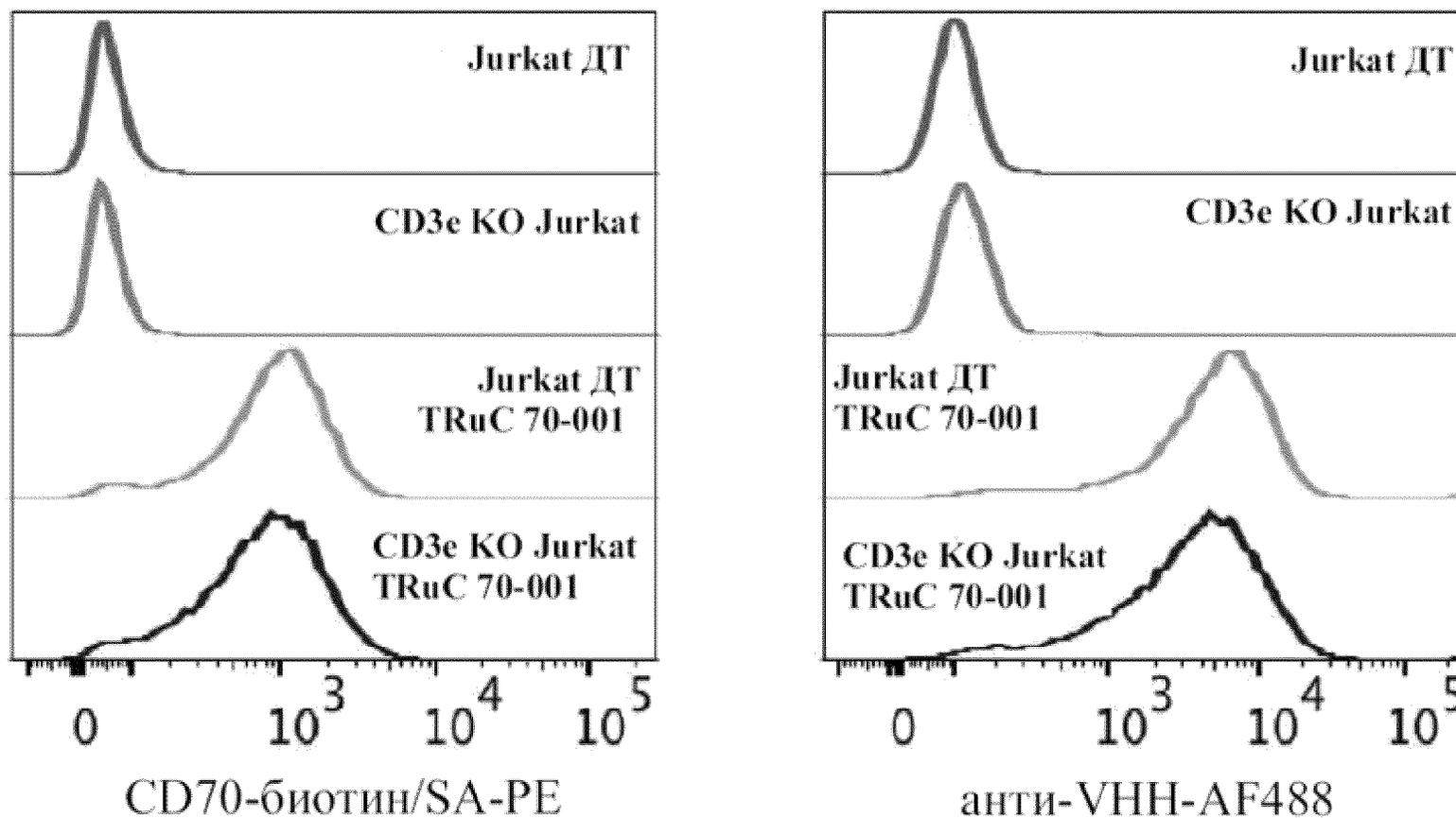
## Определение фенотипа TRuC на 10 день: CD28 и CD69



50/118

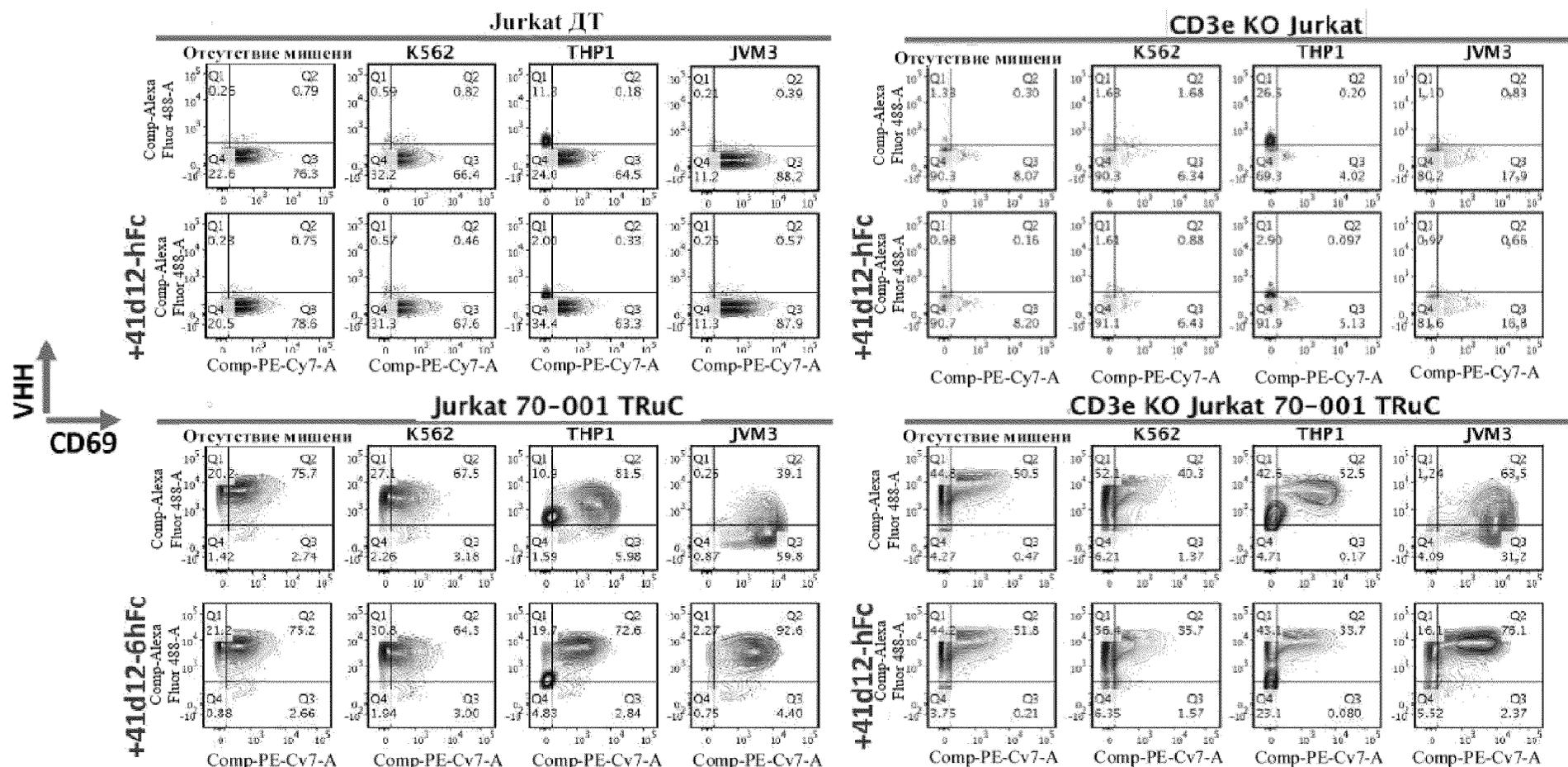
ФИГ. 28

# Получение Jurkat ДТ и CD3e КО TRuC 70-001



ФИГ. 29

# Сигналинг CD69 в Jurkat с TRuC 70-001 и контроль с помощью $\alpha$ CD70 41d12

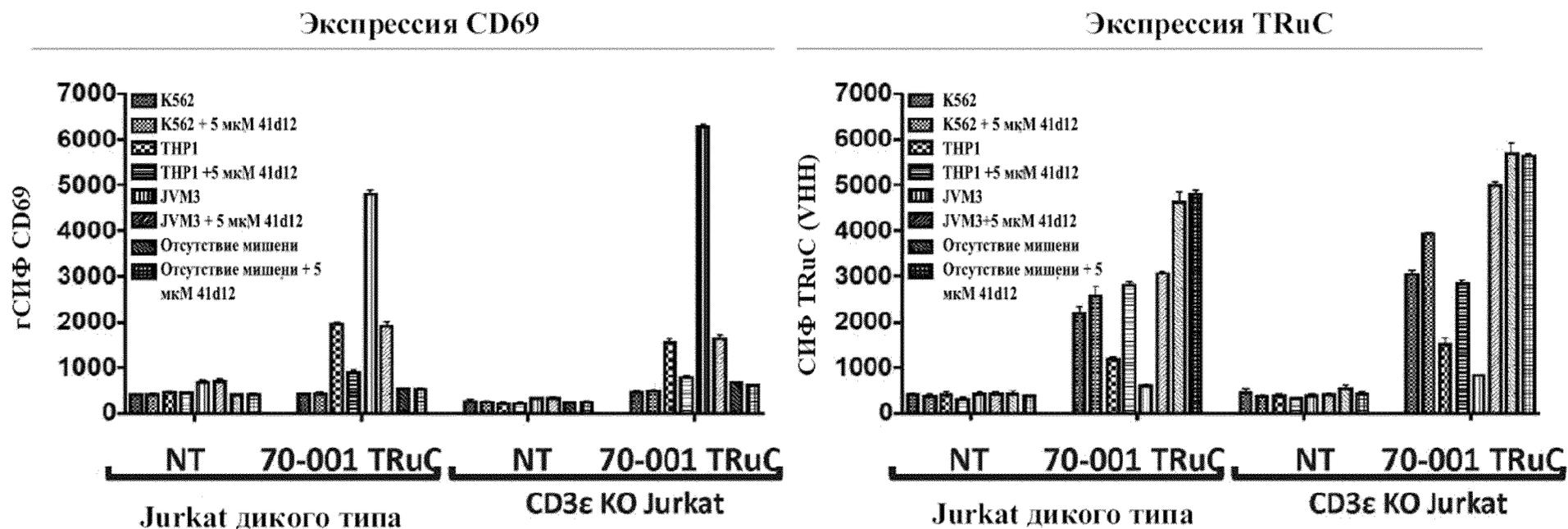


52/118

ФИГ. 30

\*Совместное культивирование 1:1 E:T, 16 часов

41d12 блокирует зависимую от клеток-мишеней индукцию CD69 с помощью TRuC 70-001

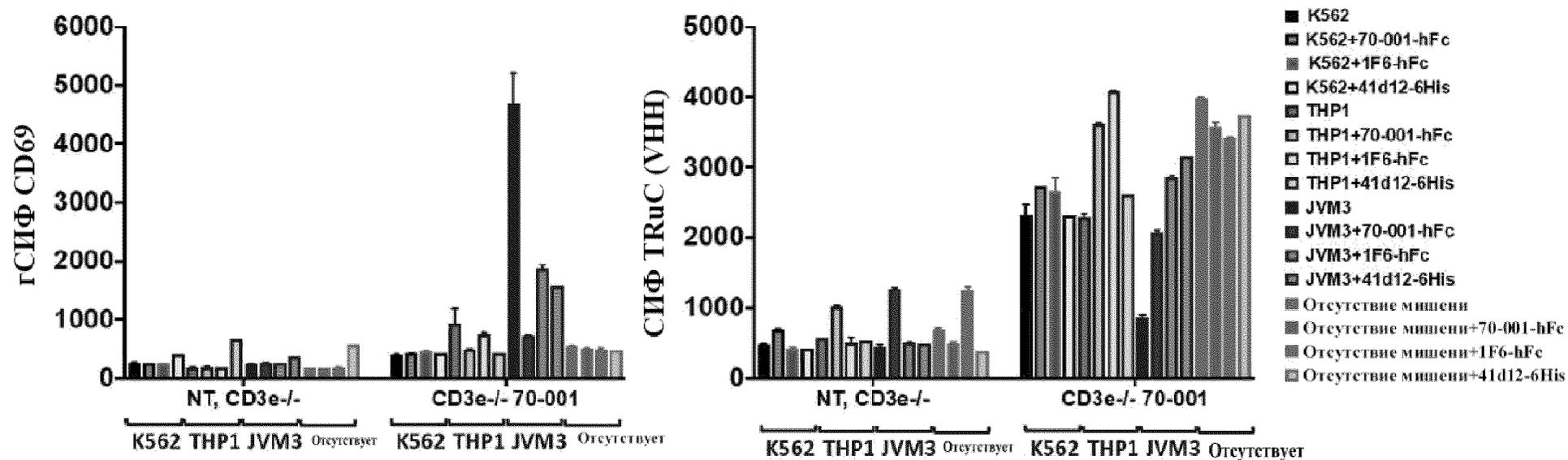


53/118

ФИГ. 31



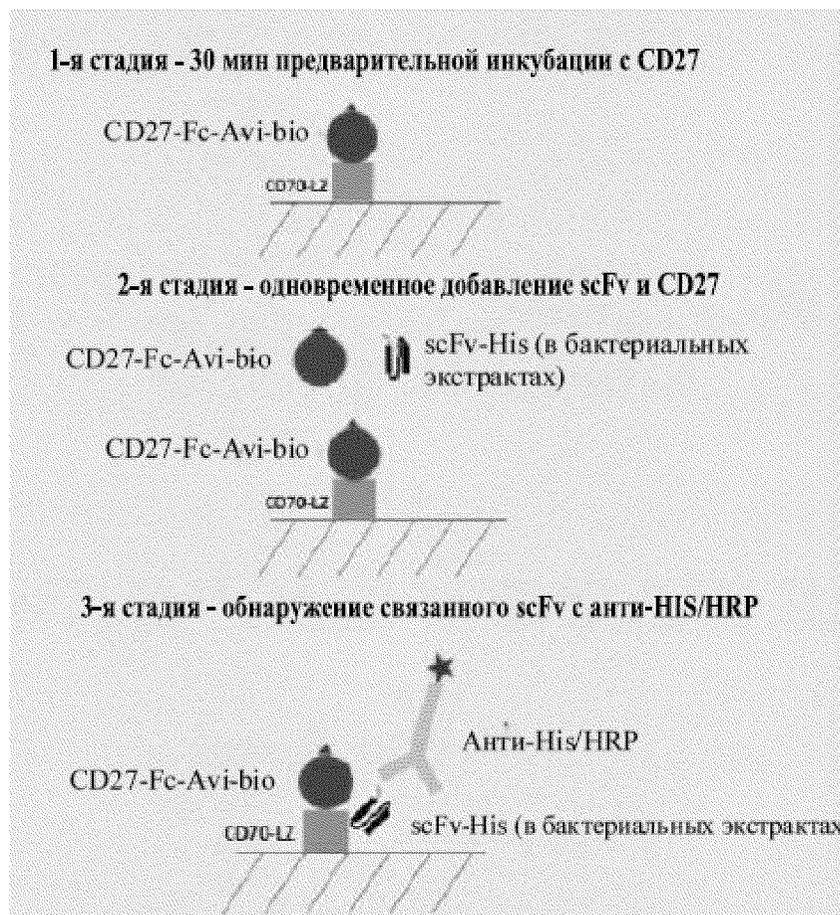
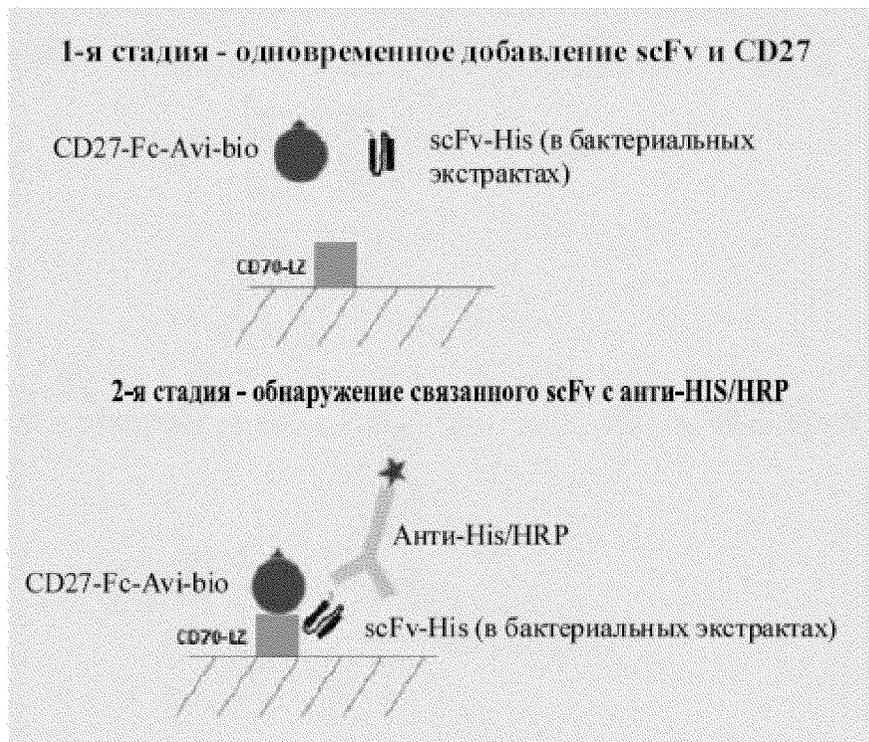
# Гибриды hFc 70-001 и 1F6 блокируют зависимую от клеток-мишеней индукцию CD69 в TRuС 70-001



55/118

ФИГ. 33

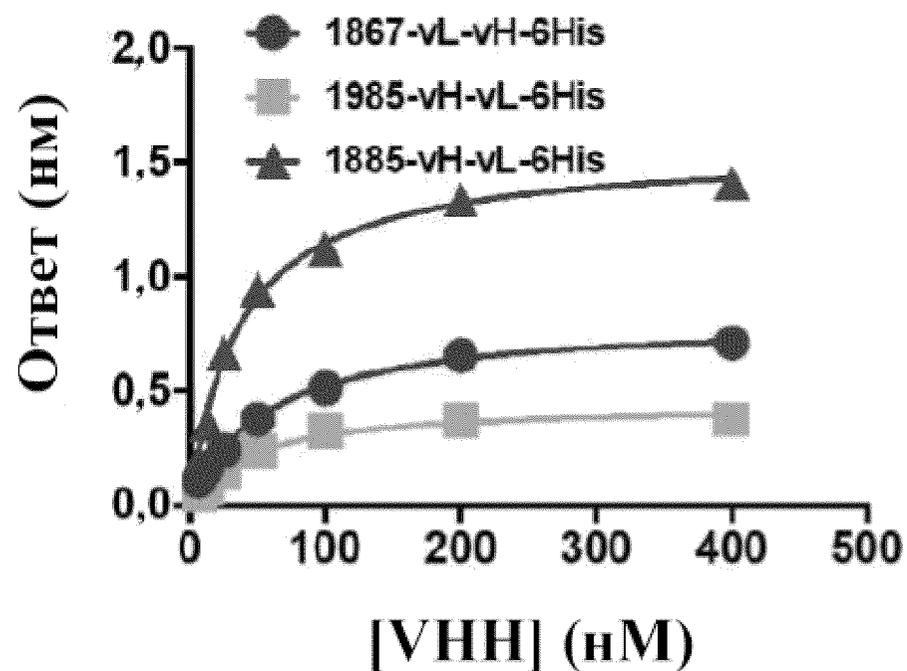
\*Совместное культивирование 1:1 E:T, 16 часов



56/118

ФИГ. 34

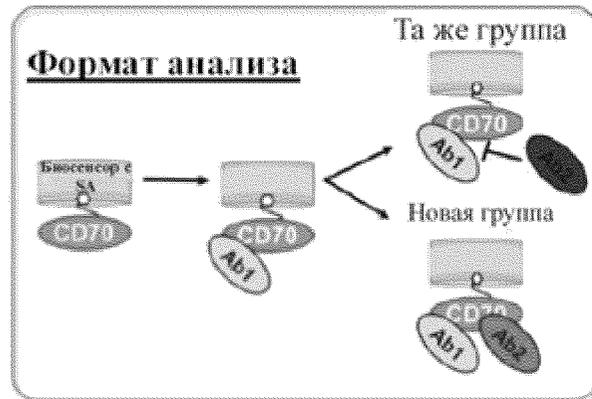
# Равновесное титрование CD70 с помощью scFv к $\alpha$ CD70



Связывающий компонент	KD (нМ)
1867-His	56,7 ± 4,4
1985-His	55,7 ± 6,8
1885-His	41,7 ± 5,5

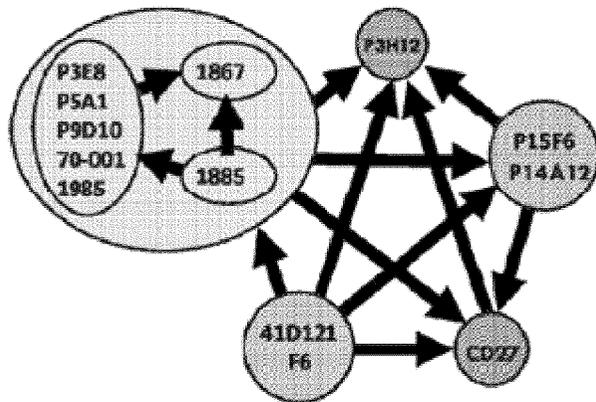
ФИГ. 35

# Эпитоп-специфическая сортировка для лиганда $\alpha$ CD70, VHH и scFv



		Антитело 2						
		1867-His	70-001-His	1985-His	P3H12-His	CD27-His	1885-His	41d12-His
Антитело 1	1867-His	0,03	0,01	0,01	-0,02	0,02	0,46	0,15
	70-001-His	0,11	0,01	0,05	0,03	0,08	0,69	0,22
	1985-His	0,15	0,04	0,02	0,01	0,10	0,74	0,22
	P3H12-His	0,34	0,10	0,09	0,09	0,16	1,01	0,49
	CD27-His	0,28	0,09	0,10	0,07	0,03	0,85	0,40
	1885-His	-0,08	-0,12	-0,08	-0,10	-0,08	0,07	0,45
	41d12-His	0,03	-0,02	0,02	0,01	-0,01	-0,02	0,04

$K_D$  100 нМ 1 пМ



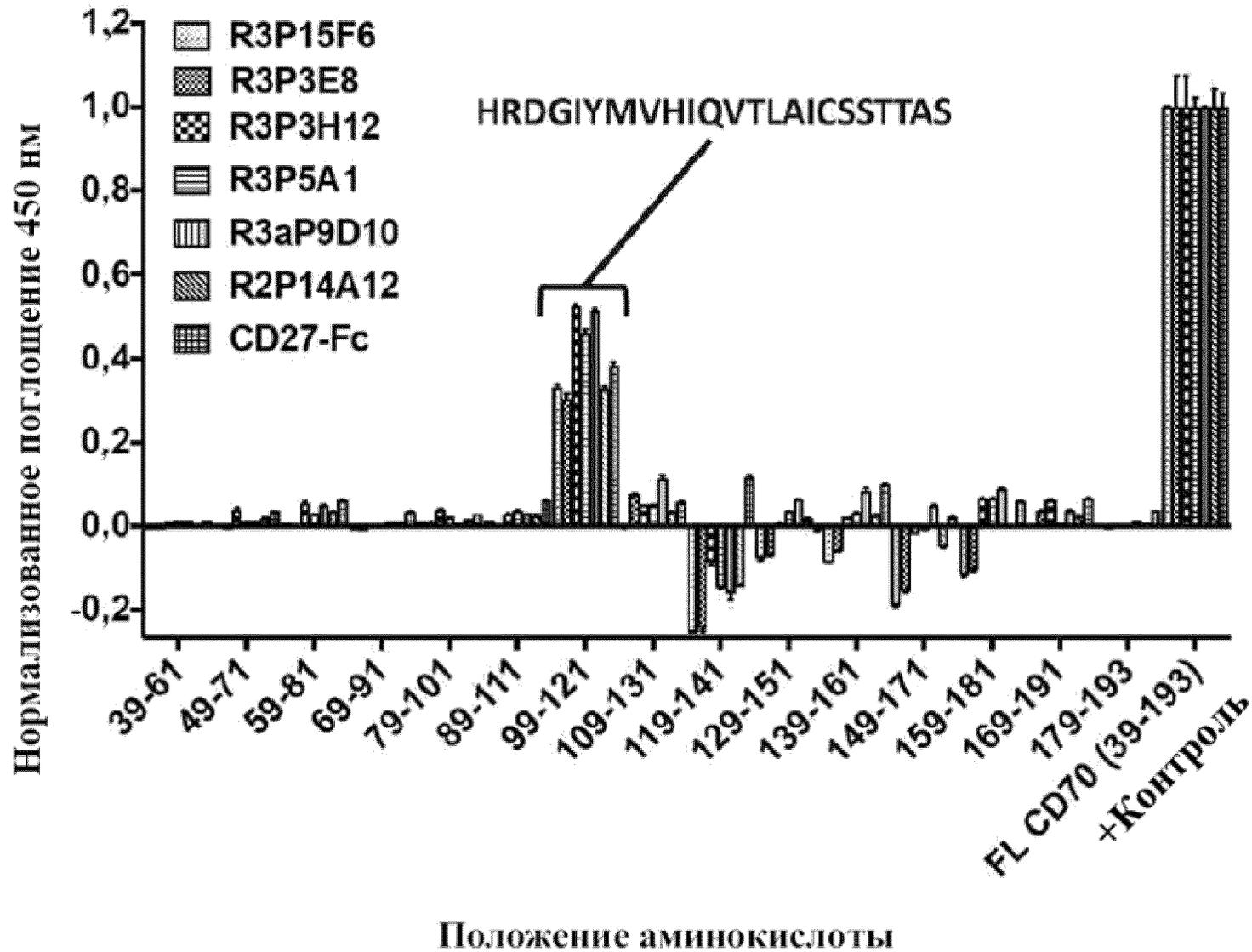
Связывающий	$K_D$ (нМ)
1867-His	56,7 ± 4,4
70-001-His	7,9 ± 1,3
1985-His	55,7 ± 6,8
P3H12-His	26,2 ± 7,5
CD27-His	129,8 ± 18,9
1885-His	41,7 ± 5,5

\*Стрелки показывают направление смещения

ФИГ. 36

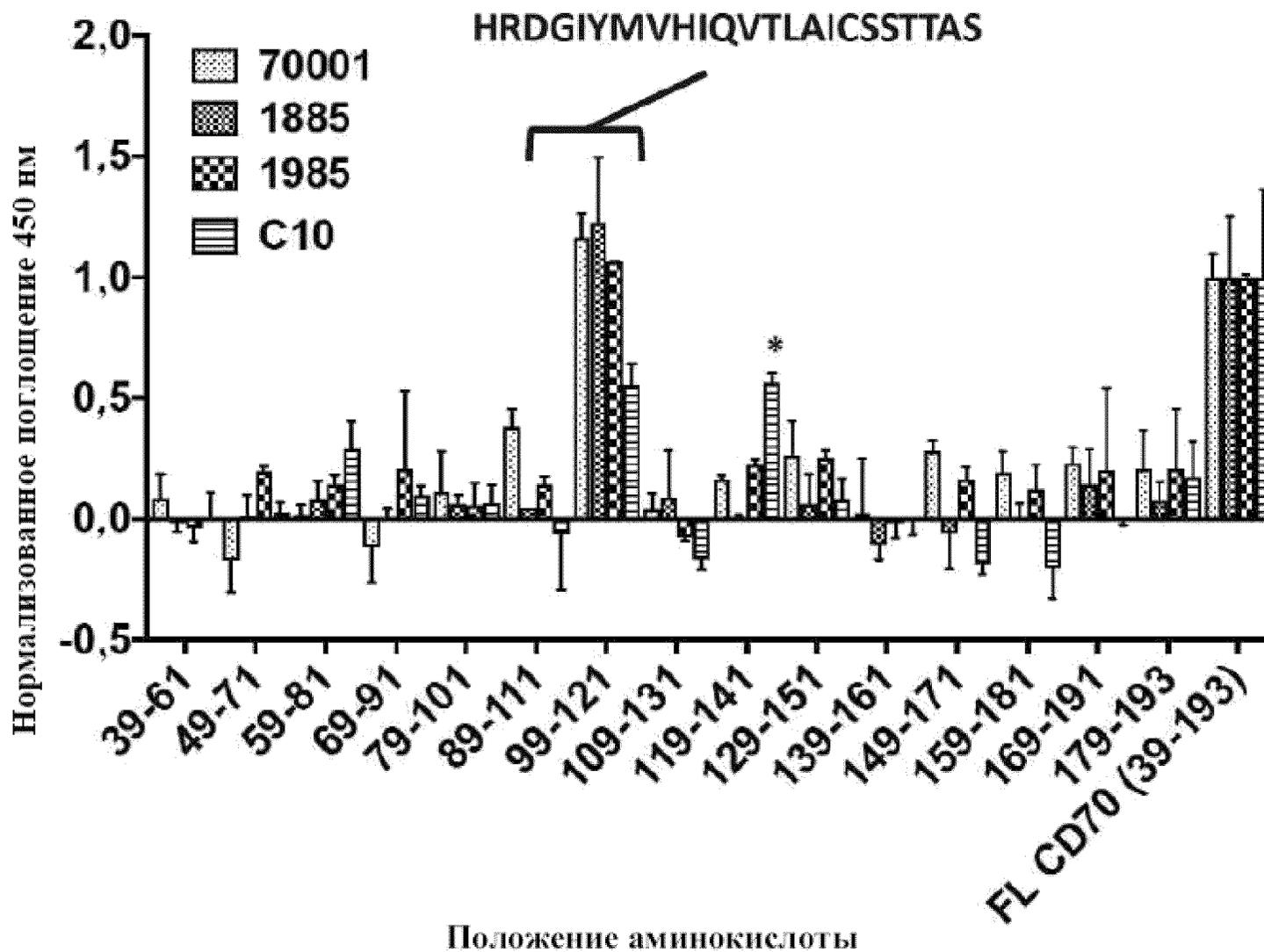
ФИГ. 37А

# Картирование эпитопов VHH



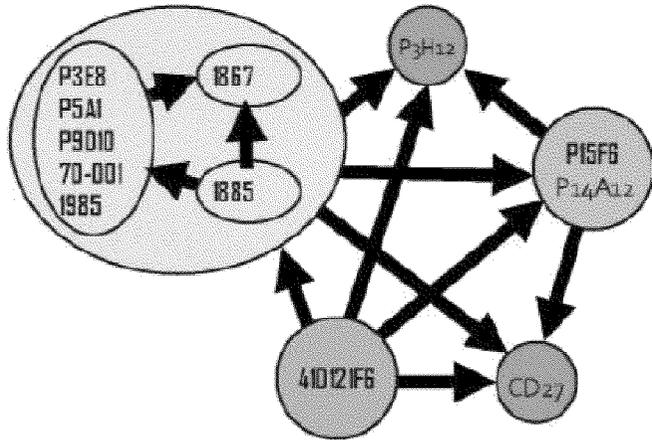
ФИГ. 37В

# Картирование эпитопов scFv

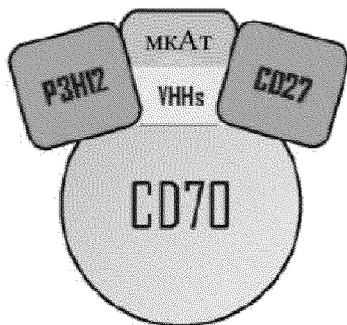


# Сравнение связывающих CD70 компонентов

Схема эпитоп-специфической сортировки



Представление схемы эпитоп-специфической сортировки

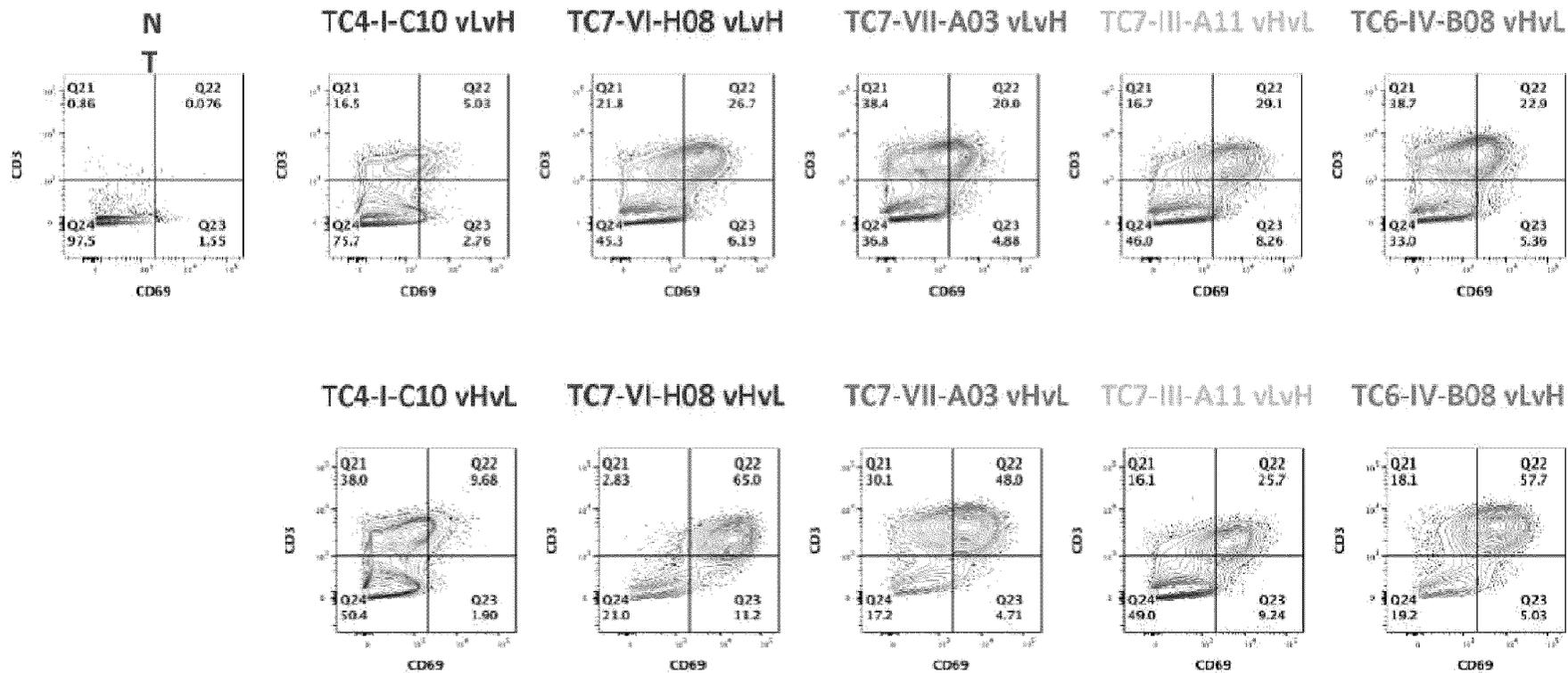


	Тип	KD (нМ)	Блокирование CD27	Эпитоп
41D12	scFv	0,02-0,34	Да	HRDGIYMVHIQVTLAICSSTAS
1885	scFv	41,7	Да	HRDGIYMVHIQVTLAICSSTAS
1985	scFv	55,7	Да	HRDGIYMVHIQVTLAICSSTAS
C10 (1867)	scFv	56,7	Да	HRDGIYMVHIQVTLAICSSTAS ASRHHPTTLAVGICSPASRSISL
70-001	VHH	4,1	Да	HRDGIYMVHIQVTLAICSSTAS
P15F6	VHH	11,6	Да	HRDGIYMVHIQVTLAICSSTAS
P3E8	VHH	8,3	Да	HRDGIYMVHIQVTLAICSSTAS
P5A1	VHH	4,9	Да	HRDGIYMVHIQVTLAICSSTAS
P3H12	VHH	19,5	Нет	HRDGIYMVHIQVTLAICSSTAS
CD27Fc	Rec	27,1	Да	HRDGIYMVHIQVTLAICSSTAS

61/118

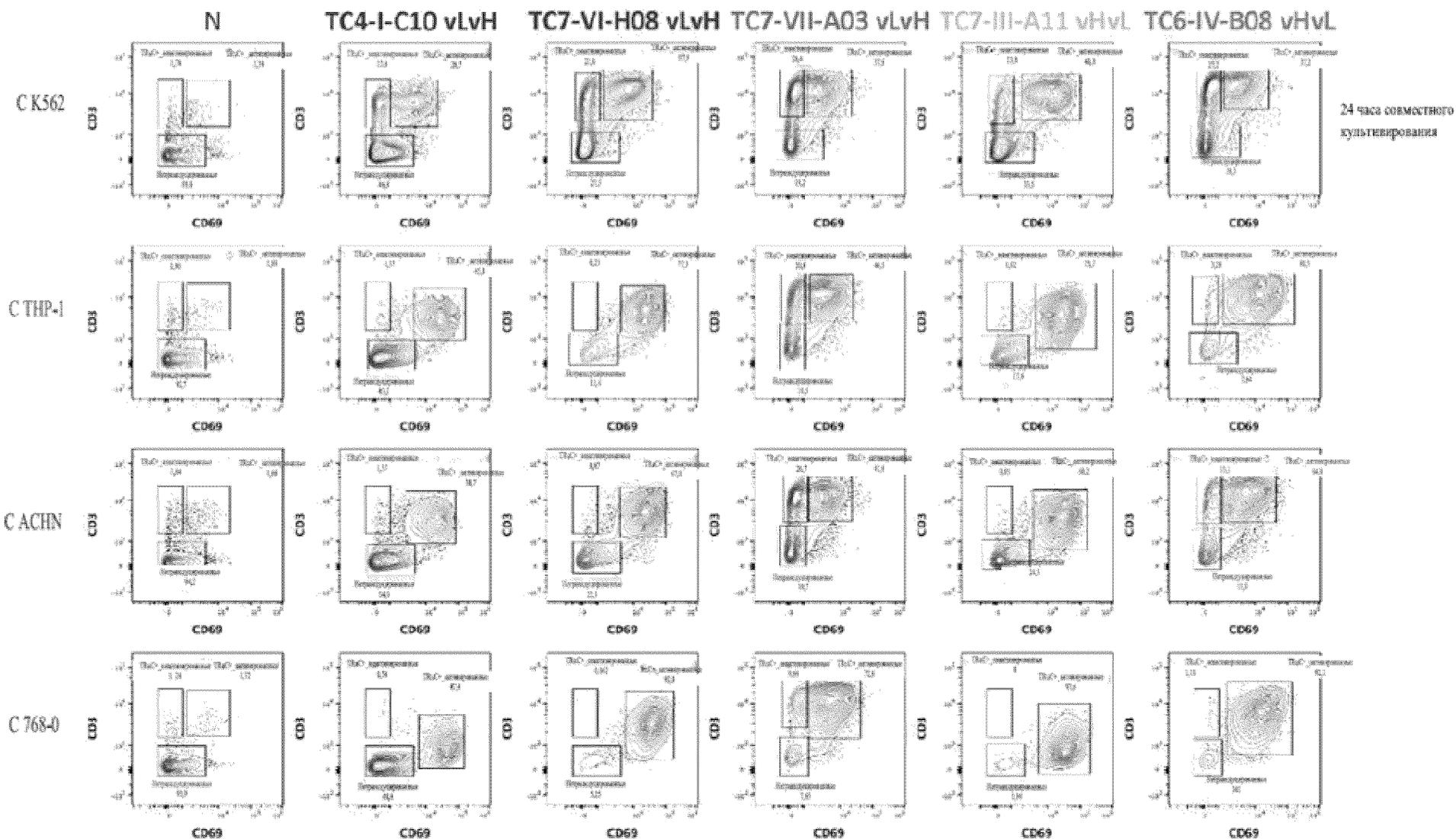
ФИГ. 37С

Вирусная трансдукция восстанавливает поверхностную экспрессию TCR на CD3ε КО Jurkat и повышает экспрессию CD69 на TRuC+ (CD3+) популяциях



ФИГ. 38

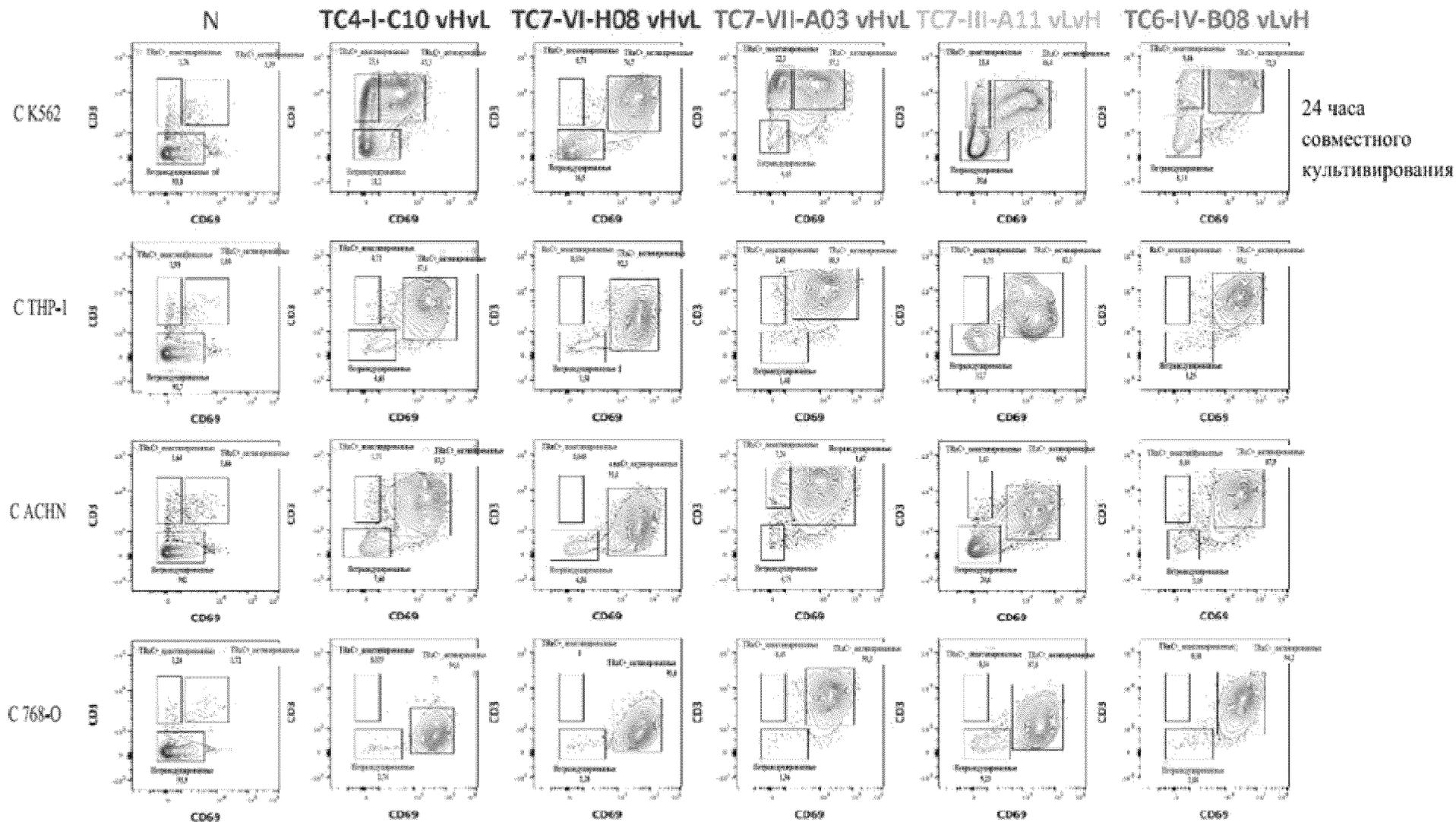
Опосредованная TRuC scFv человека CD70-специфическая активация клеток (Jurkat)



63/118

Фиг. 39А

Опосредованная TRuC scFv человека CD70-специфическая активация клеток (Jurkat)

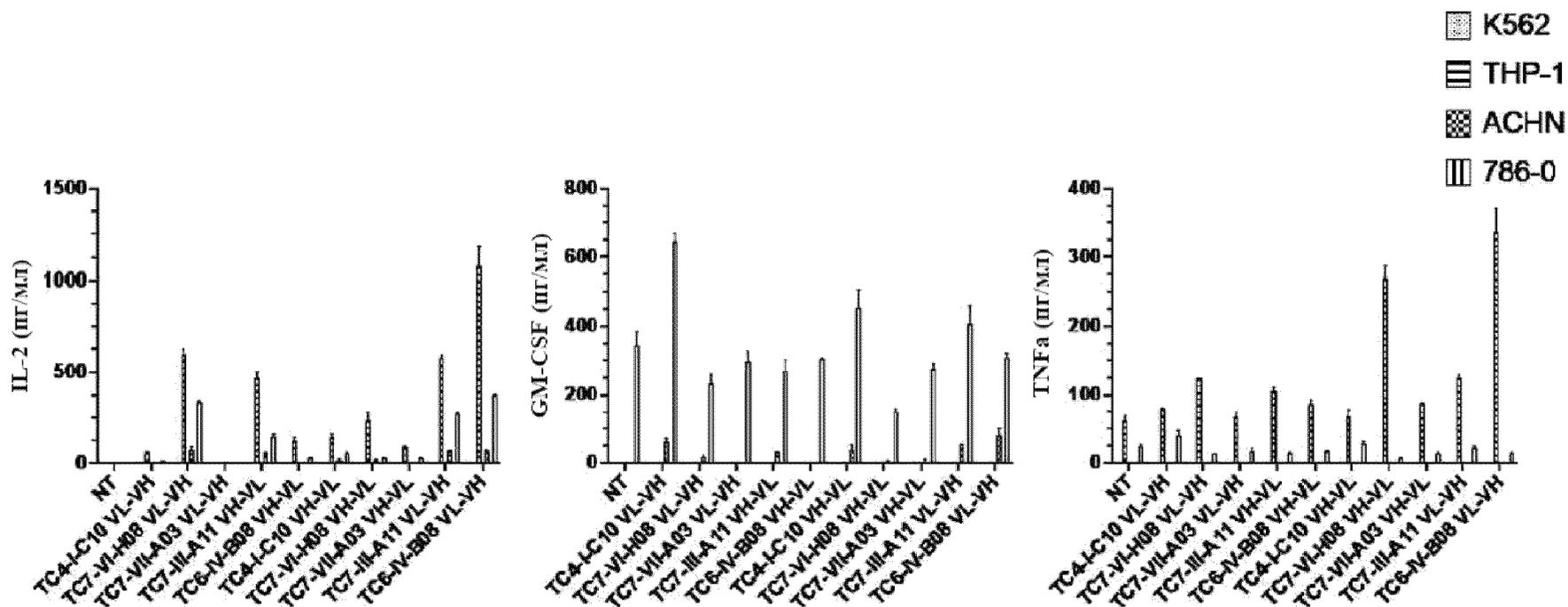


64/118

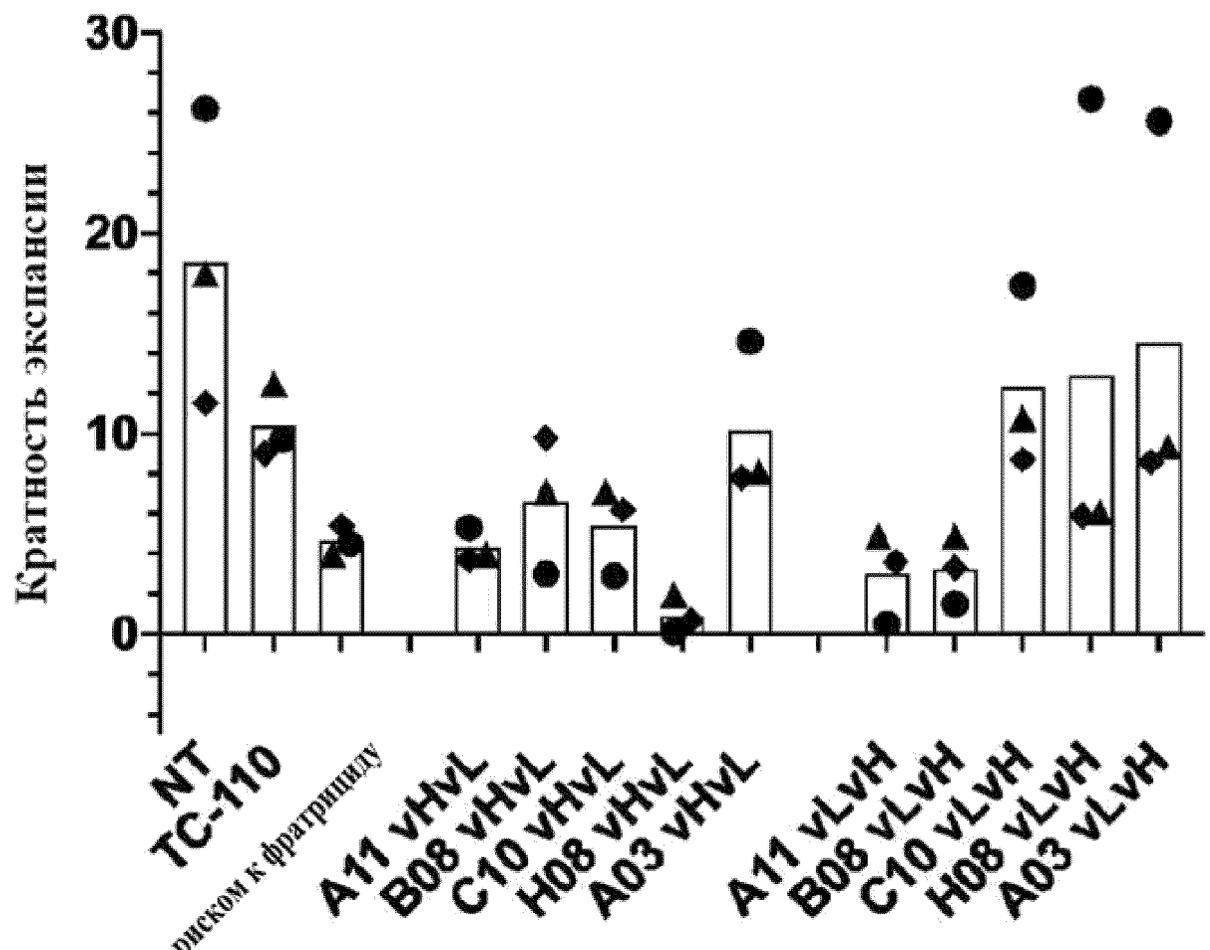
ФИГ. 39В

# Продукция цитокинов из той же совместной культуры (Jurkat)

24 часа совместного культивирования

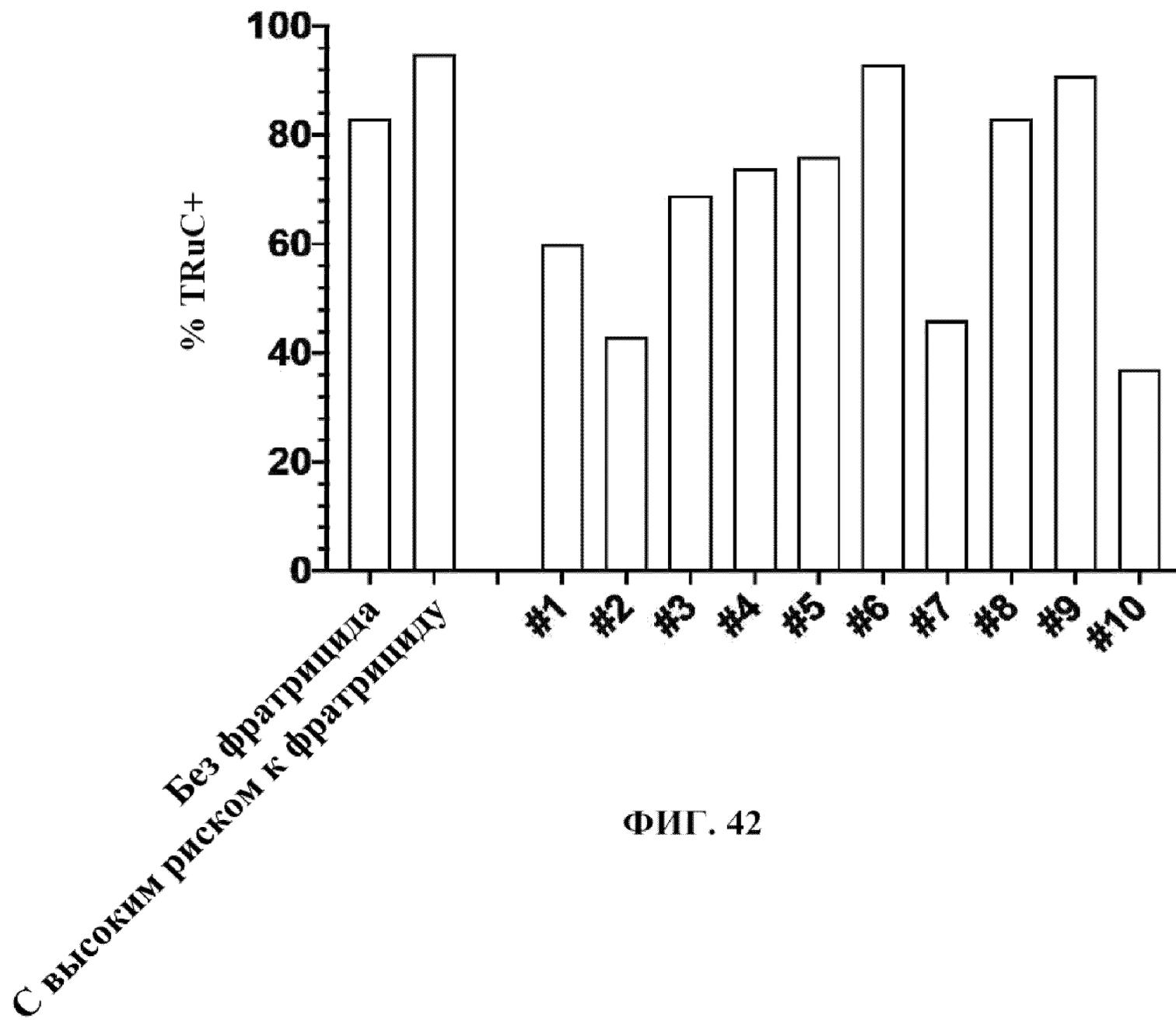


ФИГ. 40



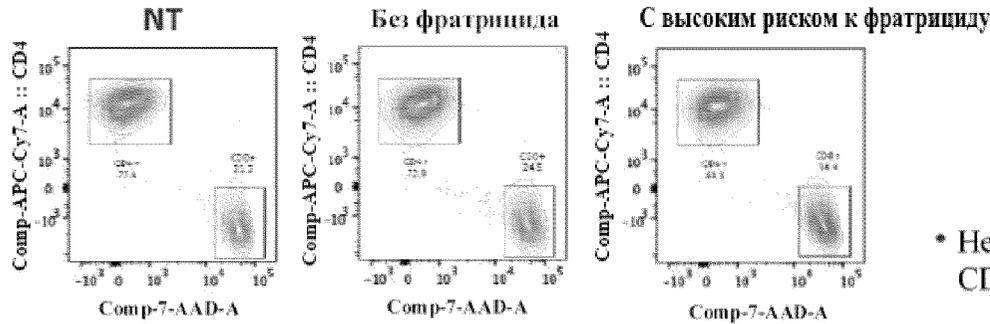
Связывающий компонент с высоким риском к фратриниду

ФИГ. 41

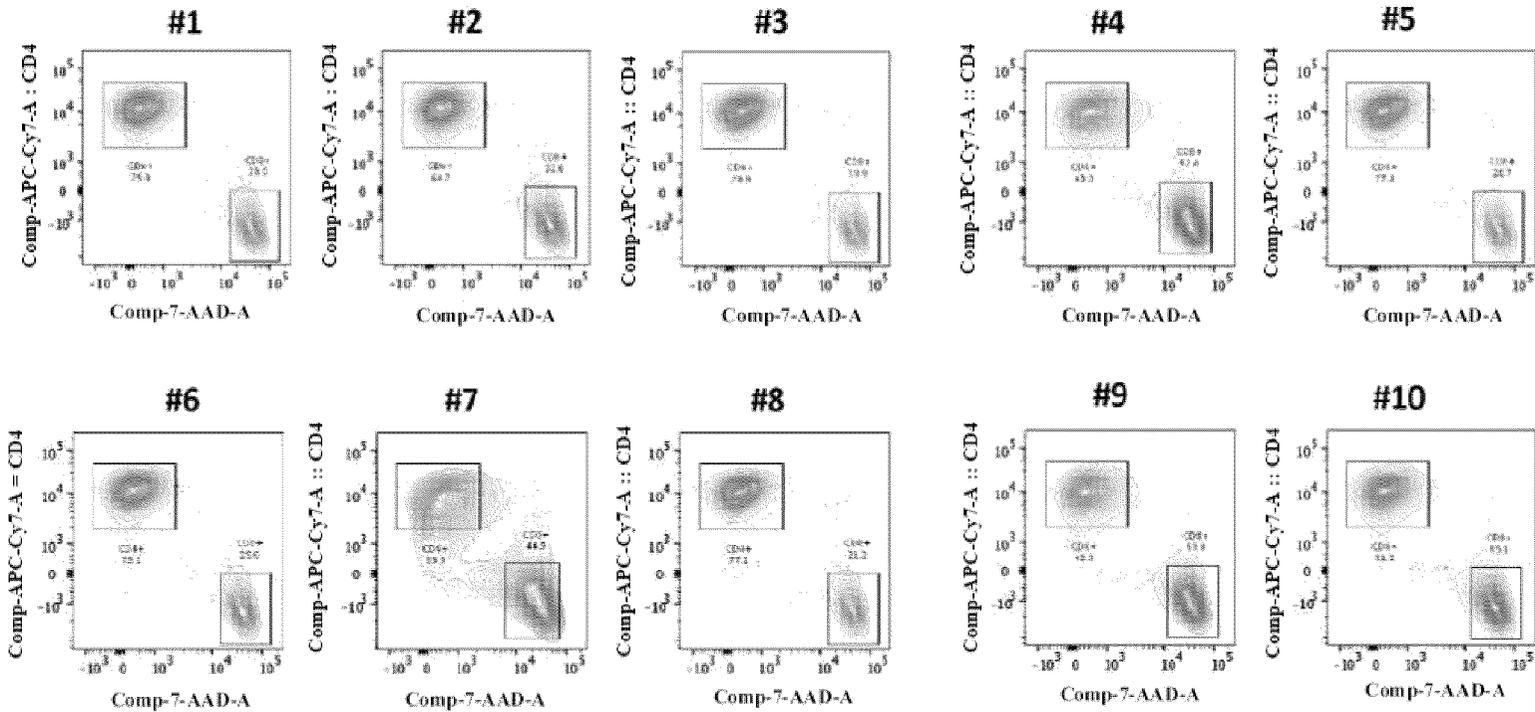
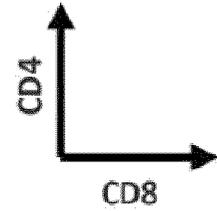


ФИГ. 42

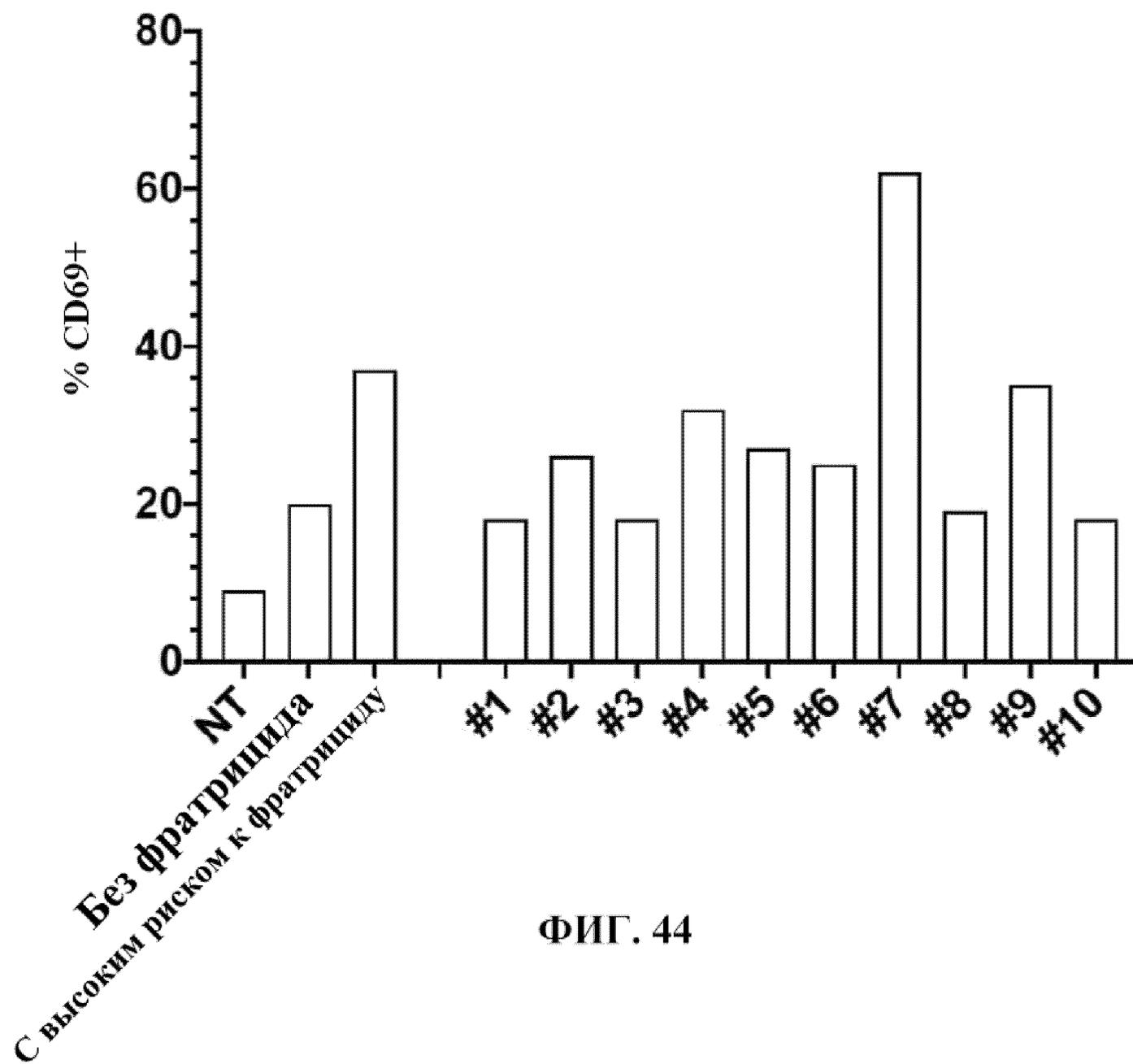
# CD4 и CD8



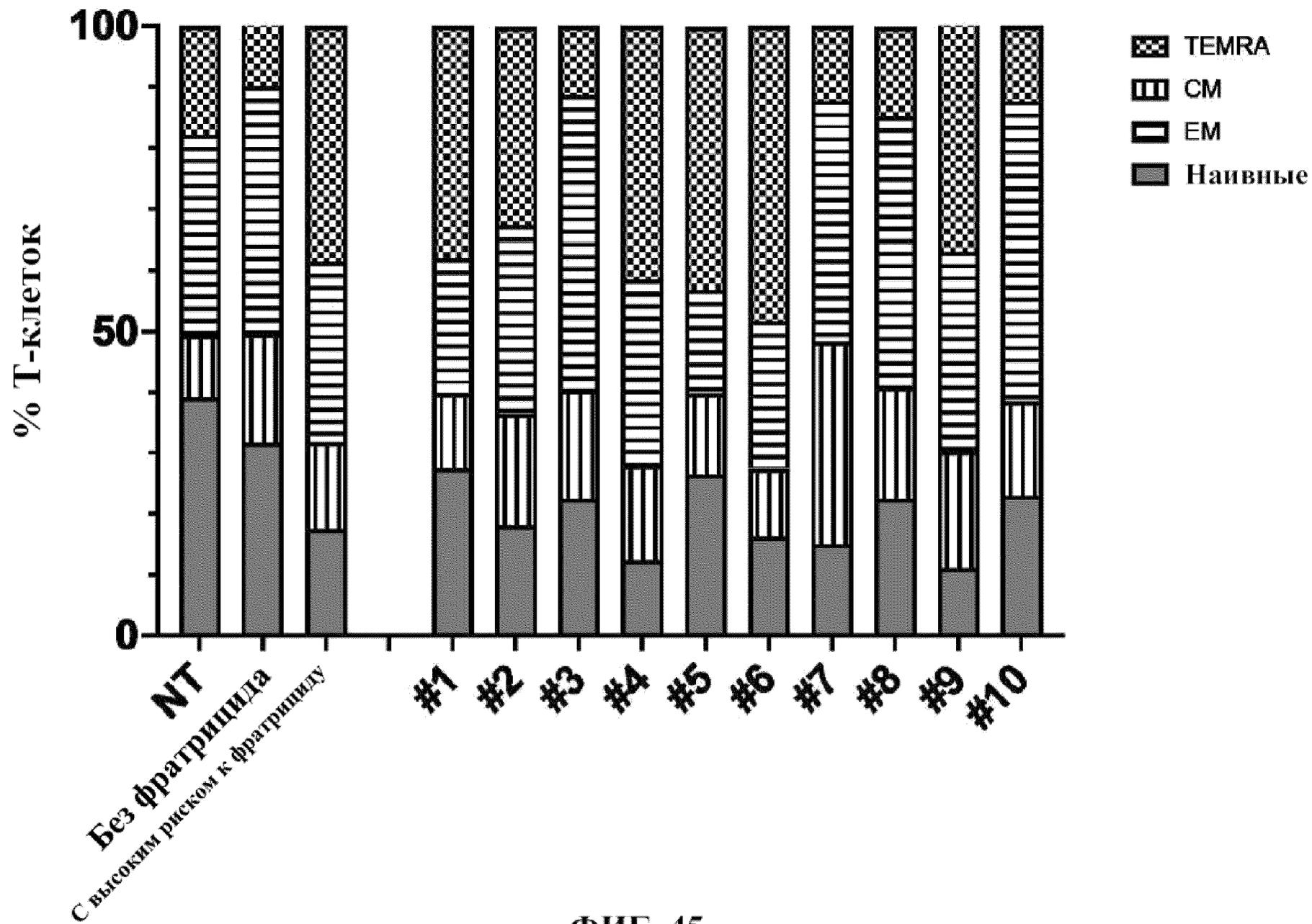
\* Некоторые TRuC CD70 демонстрируют такое же соотношение CD4/CD8, как NT и TC-110.



ФИГ. 43



ФИГ. 44



70/118

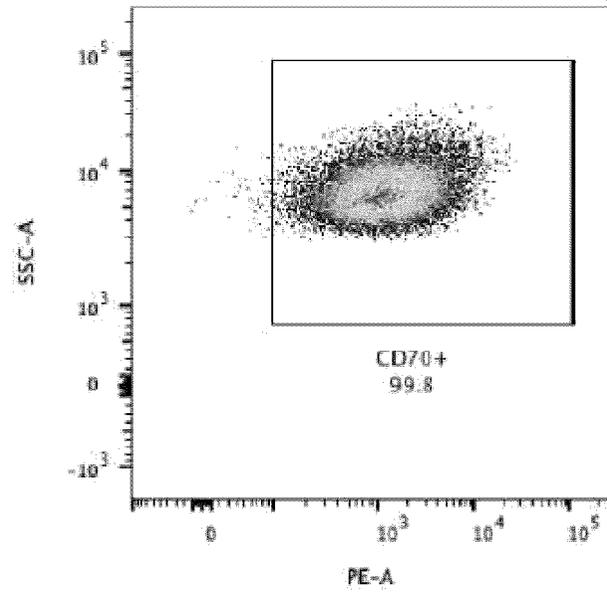
ФИГ. 45

	Без фратрицида (не нацеленный на CD70 TRuC)	С высоким риском к фратрициду (нацеленный на CD70 TRuC)	Кандидаты TRuC, специфичные для CD70									
			№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10
Экспансия	Нормальные	Низкая	*	*	*	X	X	X	X	*	X	X
Экспрессия TRuC	Высокая	Высокая	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Активация	Низкая	Высокая	*	X	*	X	X	X	X	*	X	*
Дифференцировка	Высокий Наивный Низкий TEMRA	Низкий наивный Высокий TEMRA	*	X	*	X	*	X	X	*	X	*

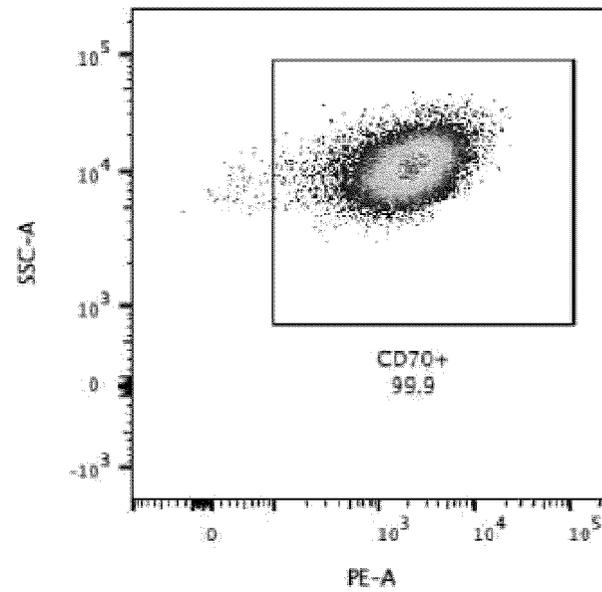
71/118

ФИГ. 46

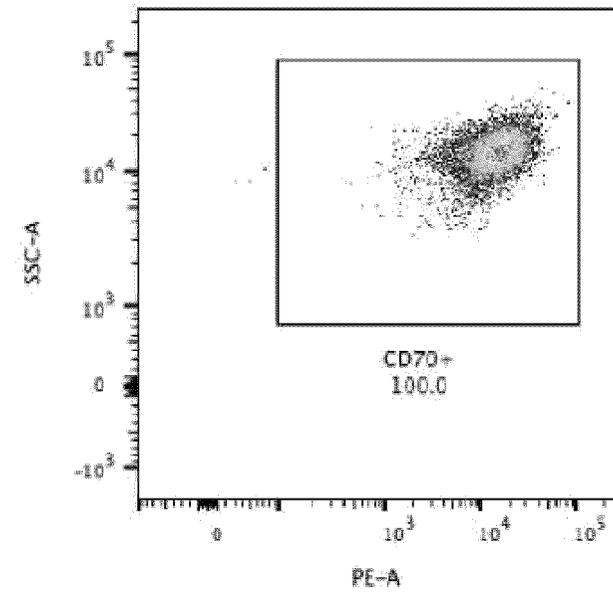
# THP-1 (AML)



# ACHN (RCC)



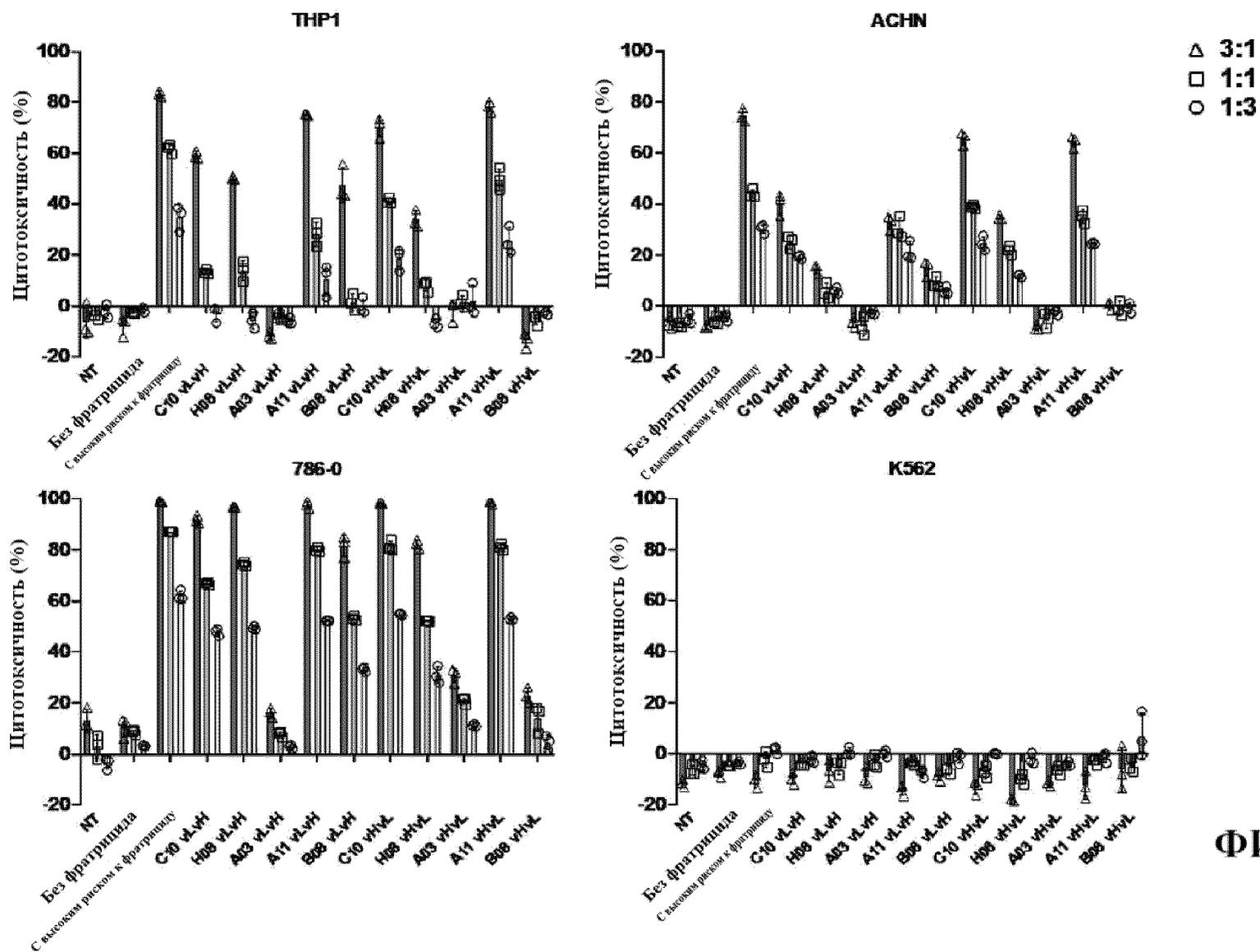
# 786-O (RCC)



72/118

ФИГ. 47

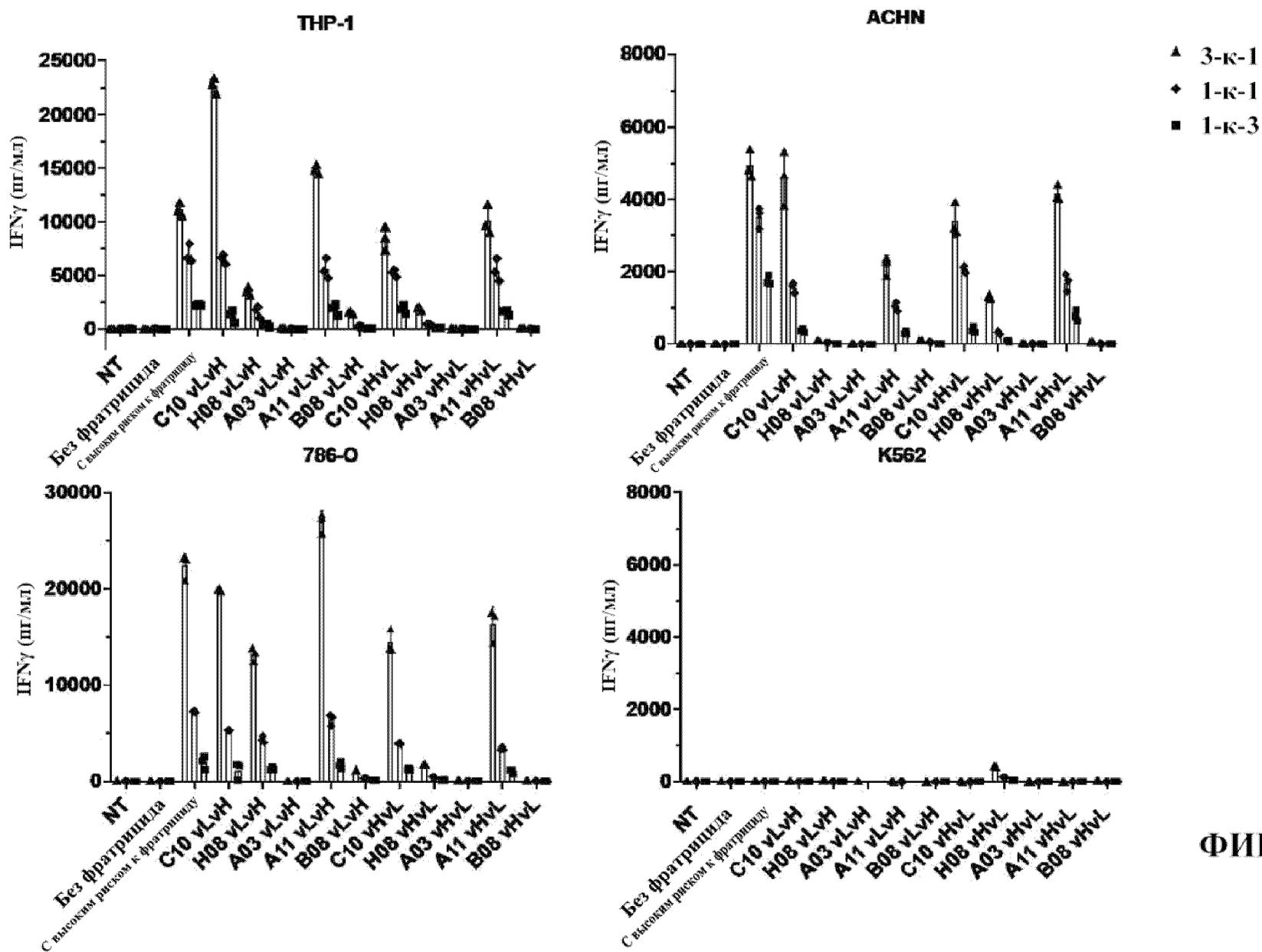
TRuС TC4-I- vLvH C10ε и TC7-VI-vLvH H08ε демонстрируют высокую активность в отношении линий клеток, экспрессирующих CD70.



73/118

ФИГ. 48

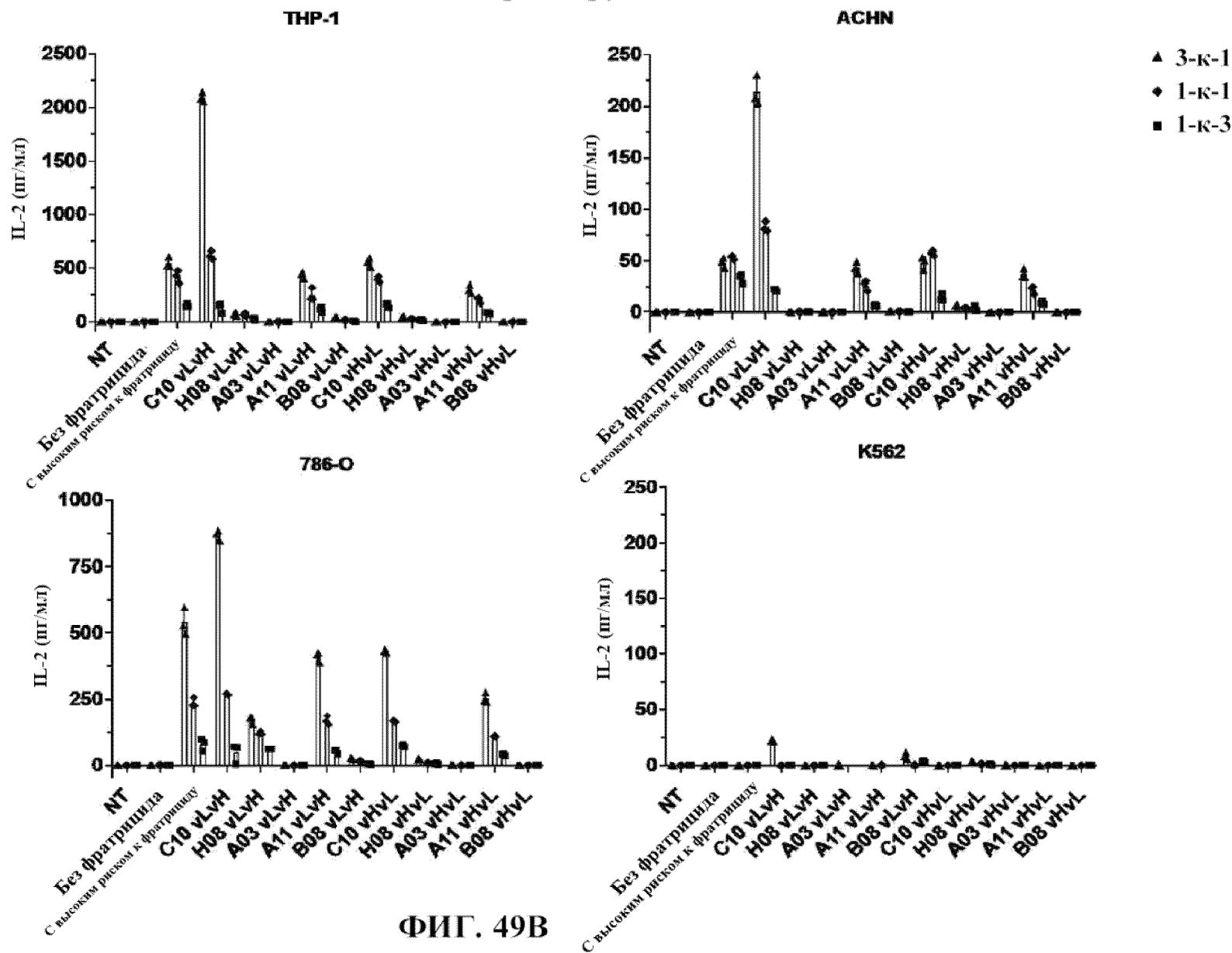
TC4-I- vLvH C10ε продуцирует высокий уровень IFN $\gamma$  в линиях клеток, экспрессирующих CD70



74/118

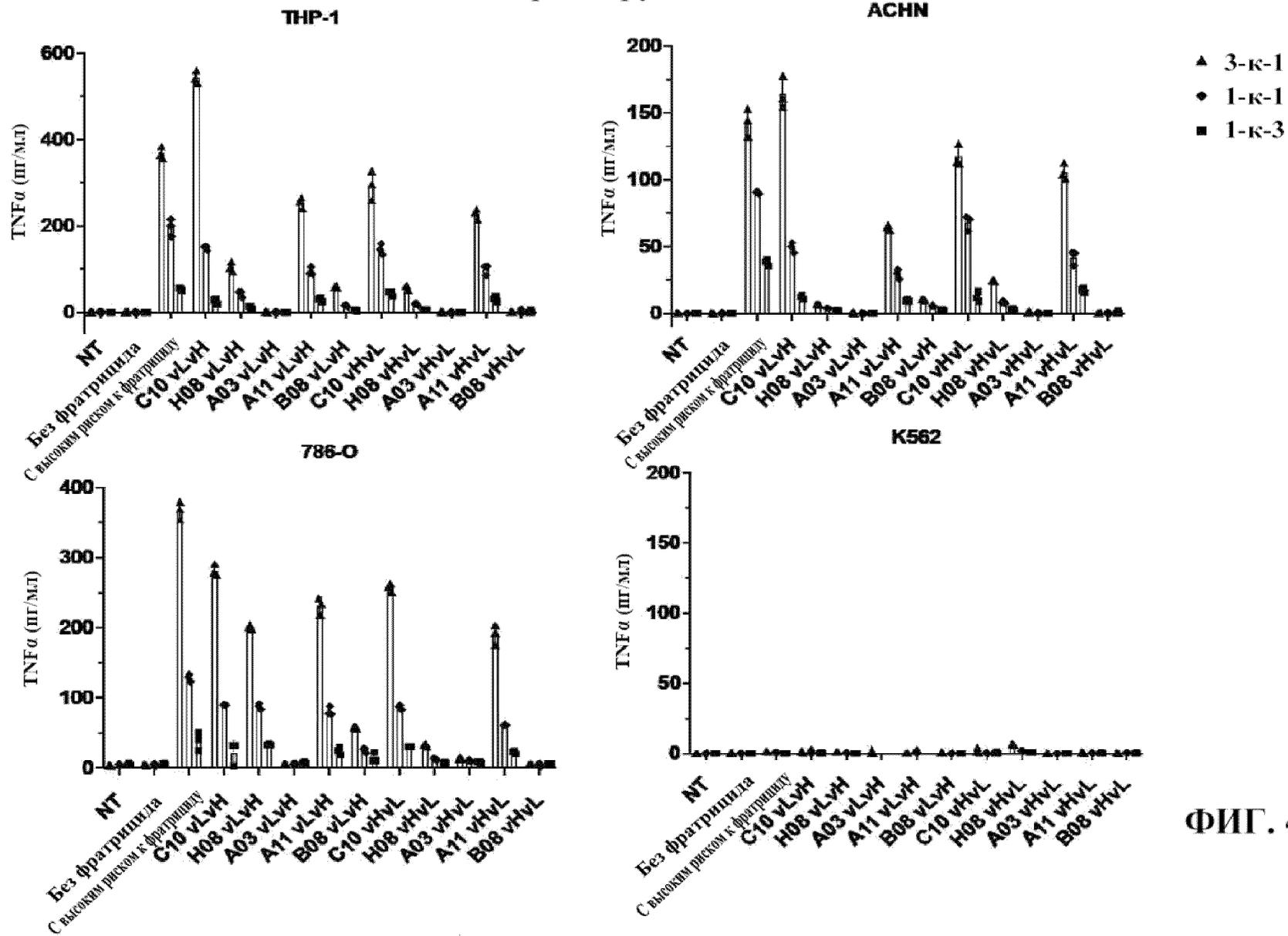
ФИГ. 49А

TC4-I- vLvH C10ε продуцирует высокий уровень IL-2 в линиях клеток, экспрессирующих CD70



ФИГ. 49В

TC4-I- vLvH C10ε продуцирует высокий уровень TNFα в линиях клеток, экспрессирующих CD70



76/118

ФИГ. 49С

TC4-1- vLvH C10ε продуцирует высокий уровень GM-CSF в линиях клеток, экспрессирующих CD70

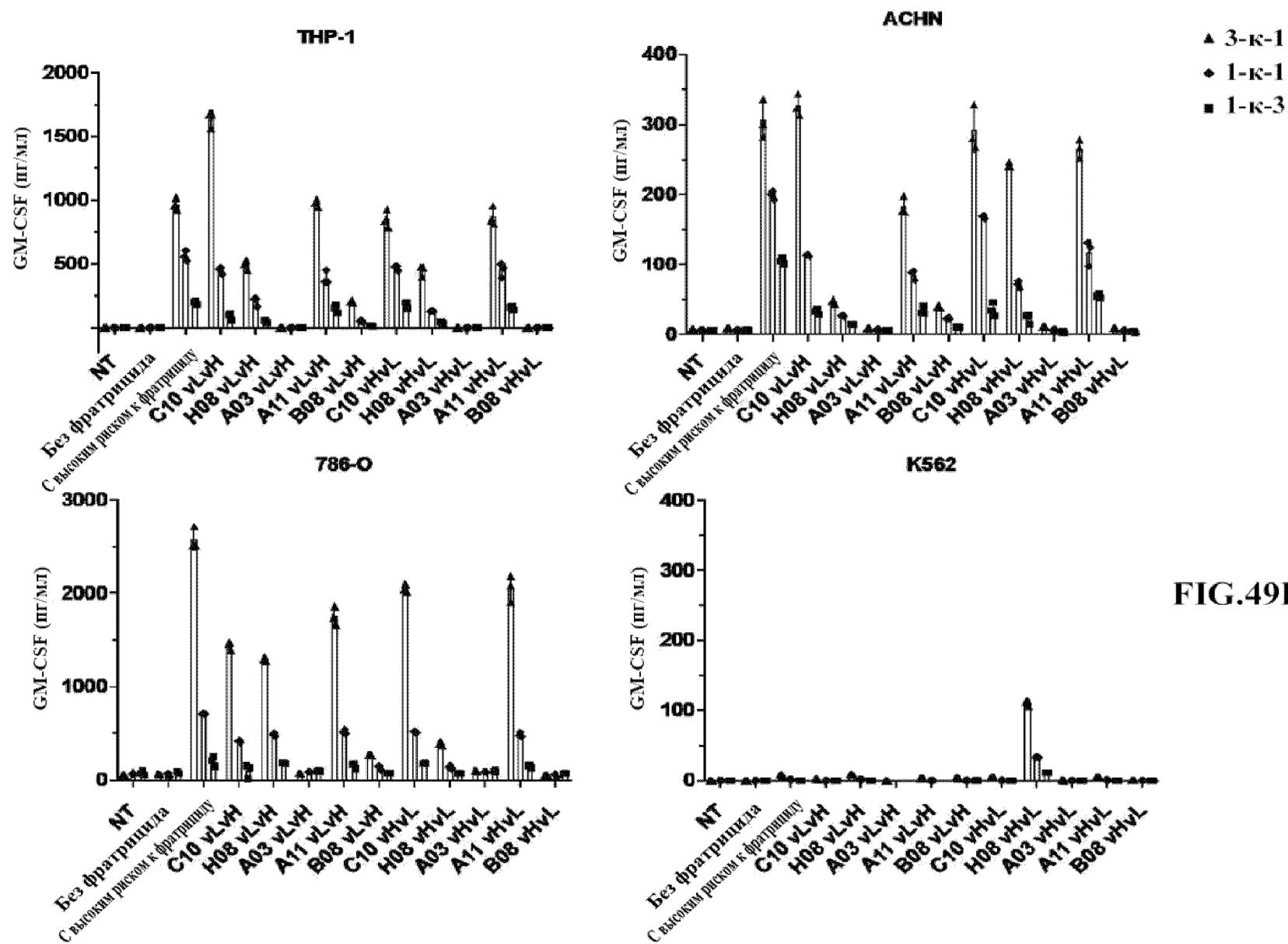
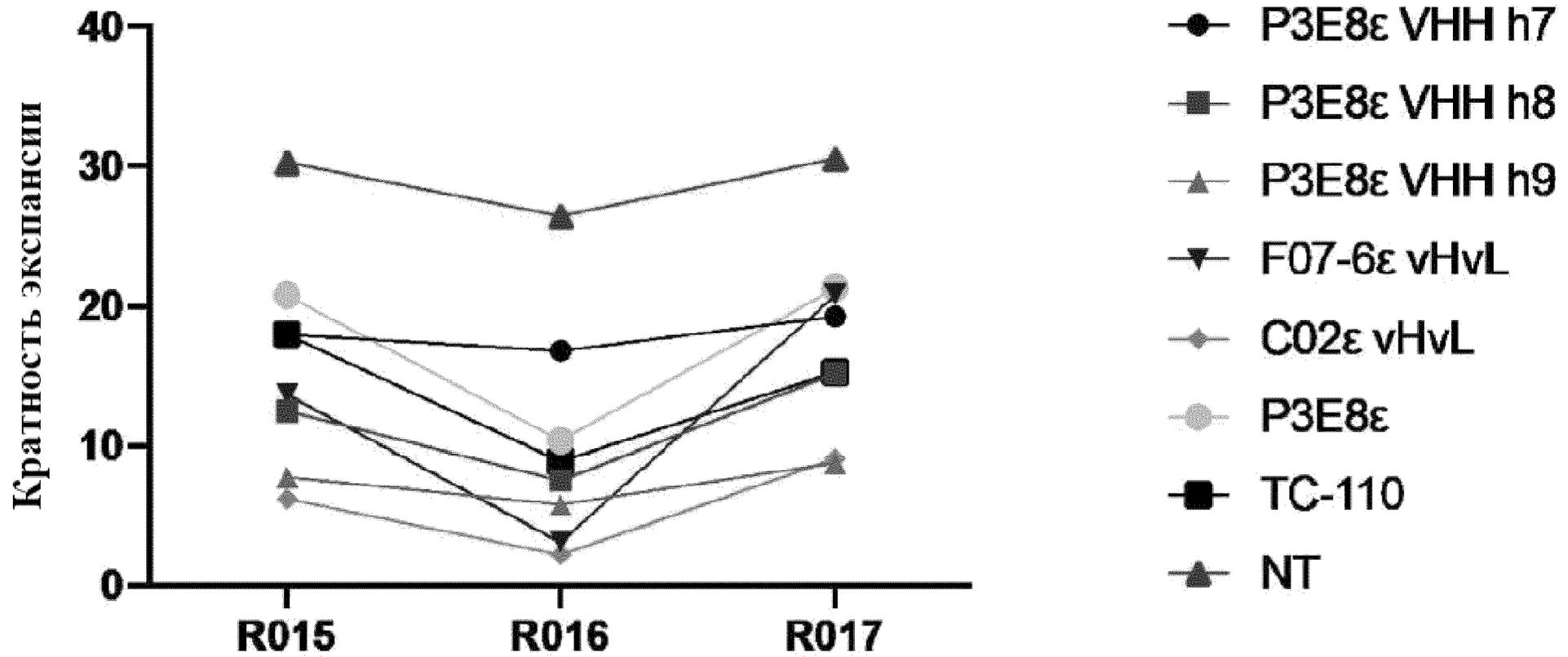


FIG.49D

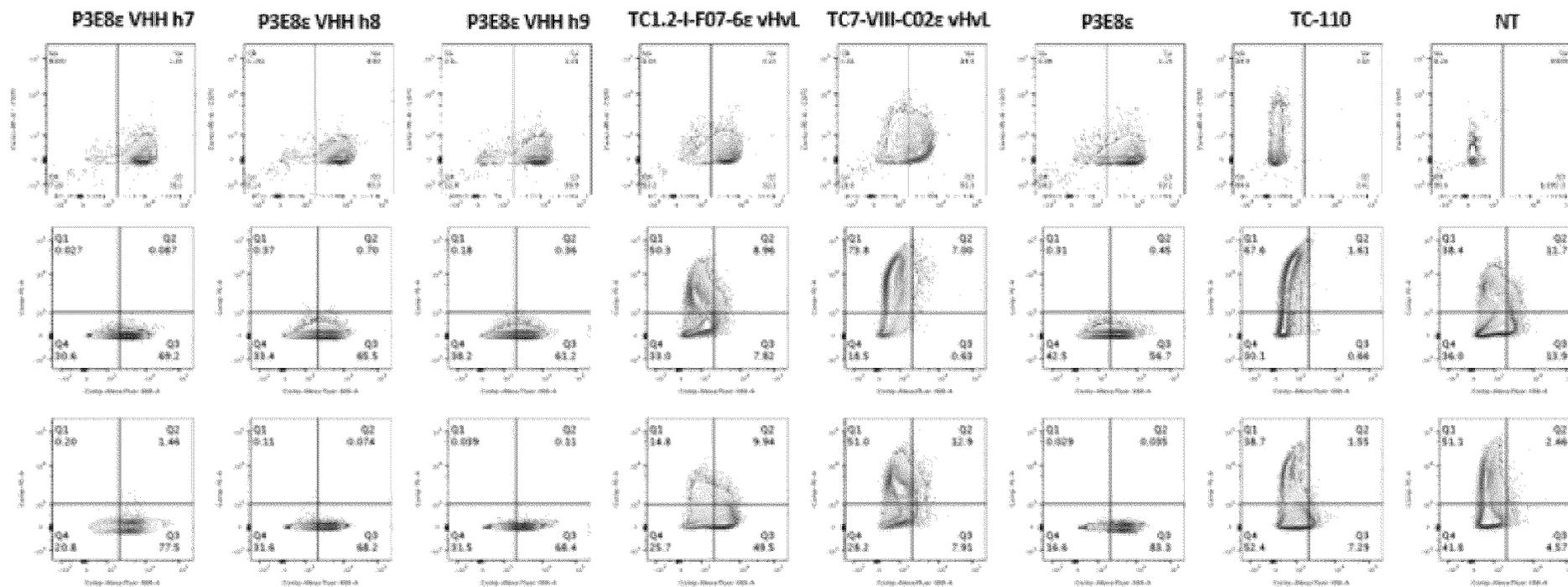
# Кратность экспансии Т-клеток



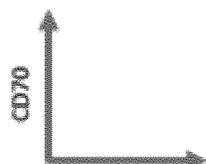
78/118

ФИГ. 50

# TRuC и CD70



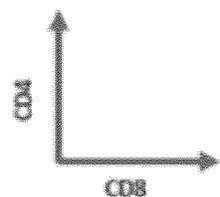
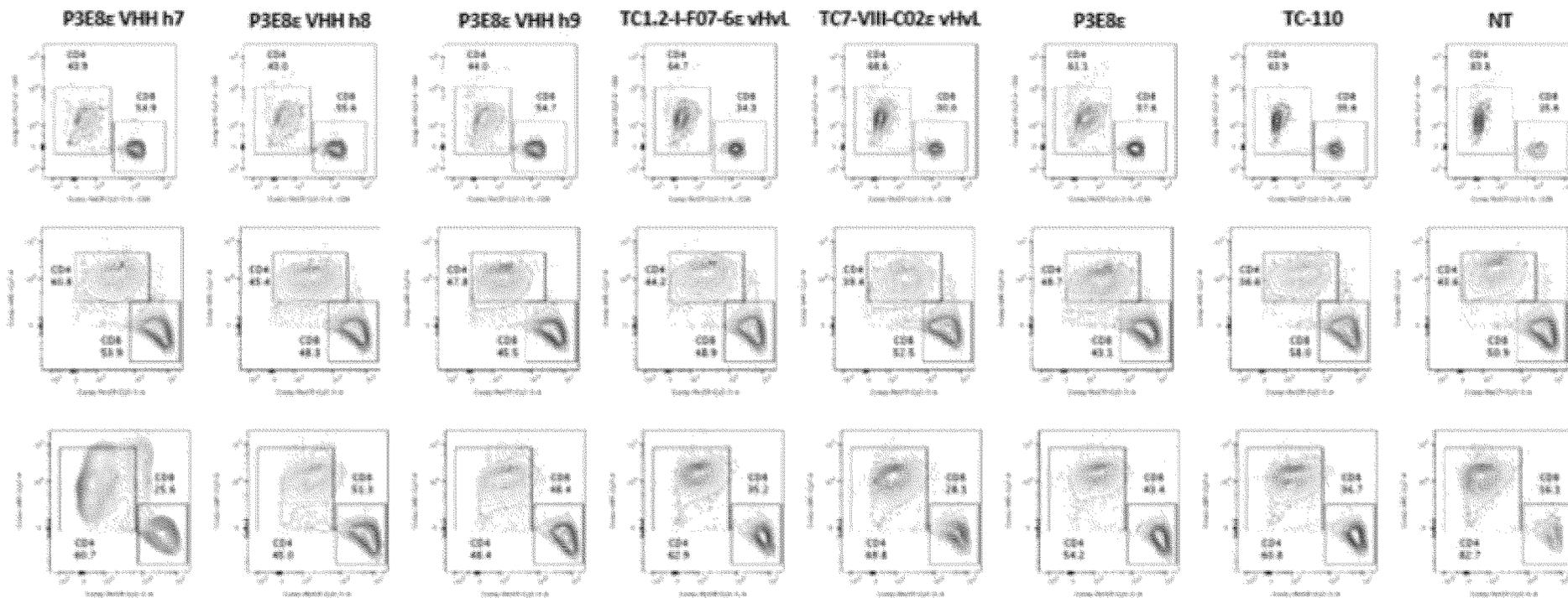
79/118



TruC Fc-метка

ФИГ. 51

# CD4 и CD8



ФИГ. 52

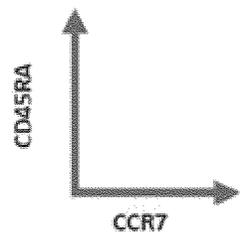
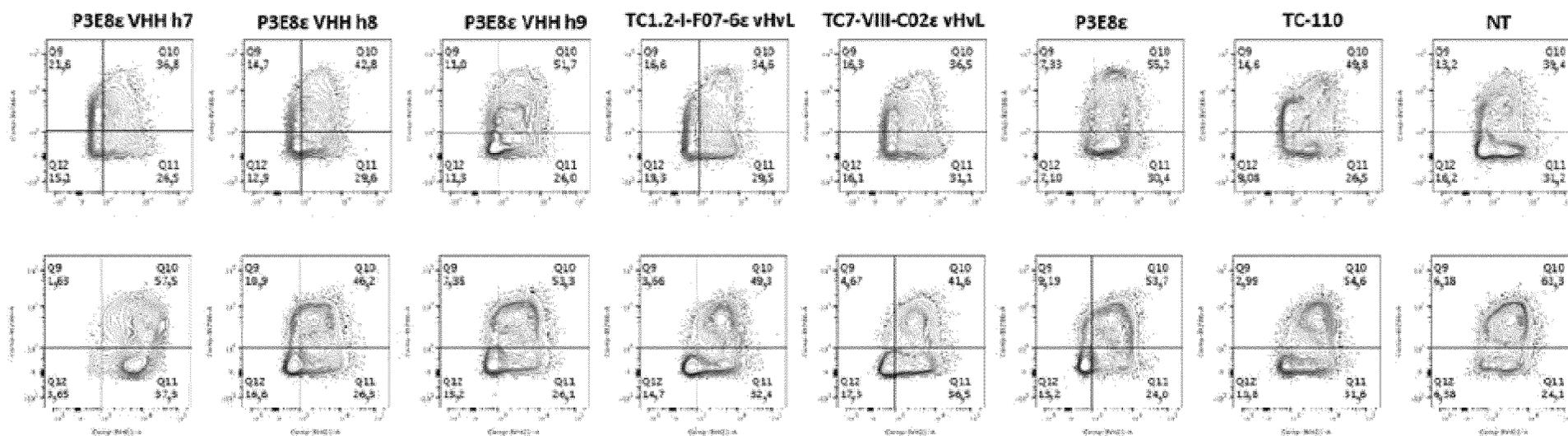
# CD45RA и CCR7

TEMRA

Нашивые

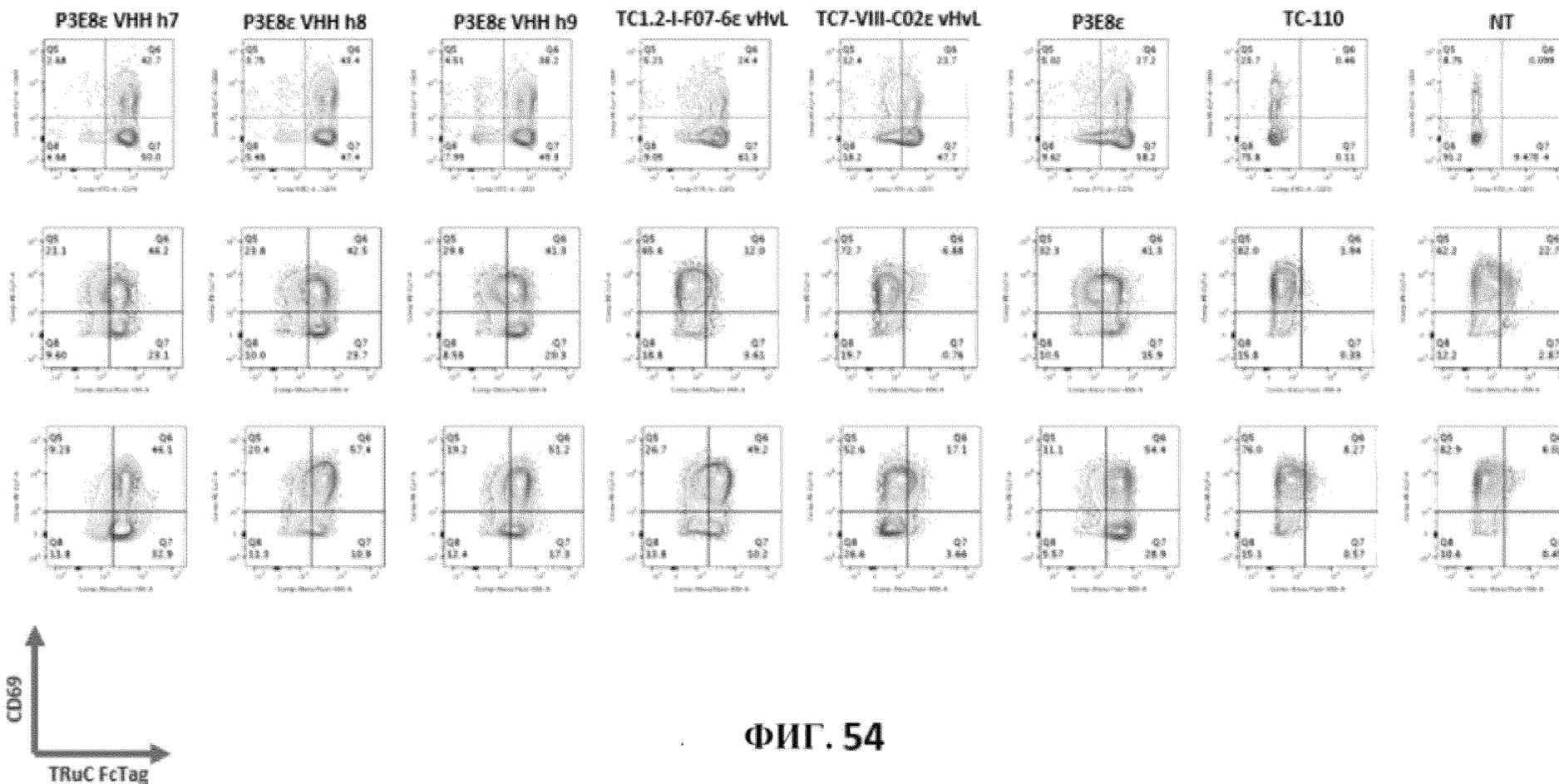
T<sub>EM</sub>

T<sub>CM</sub>



ФИГ. 53

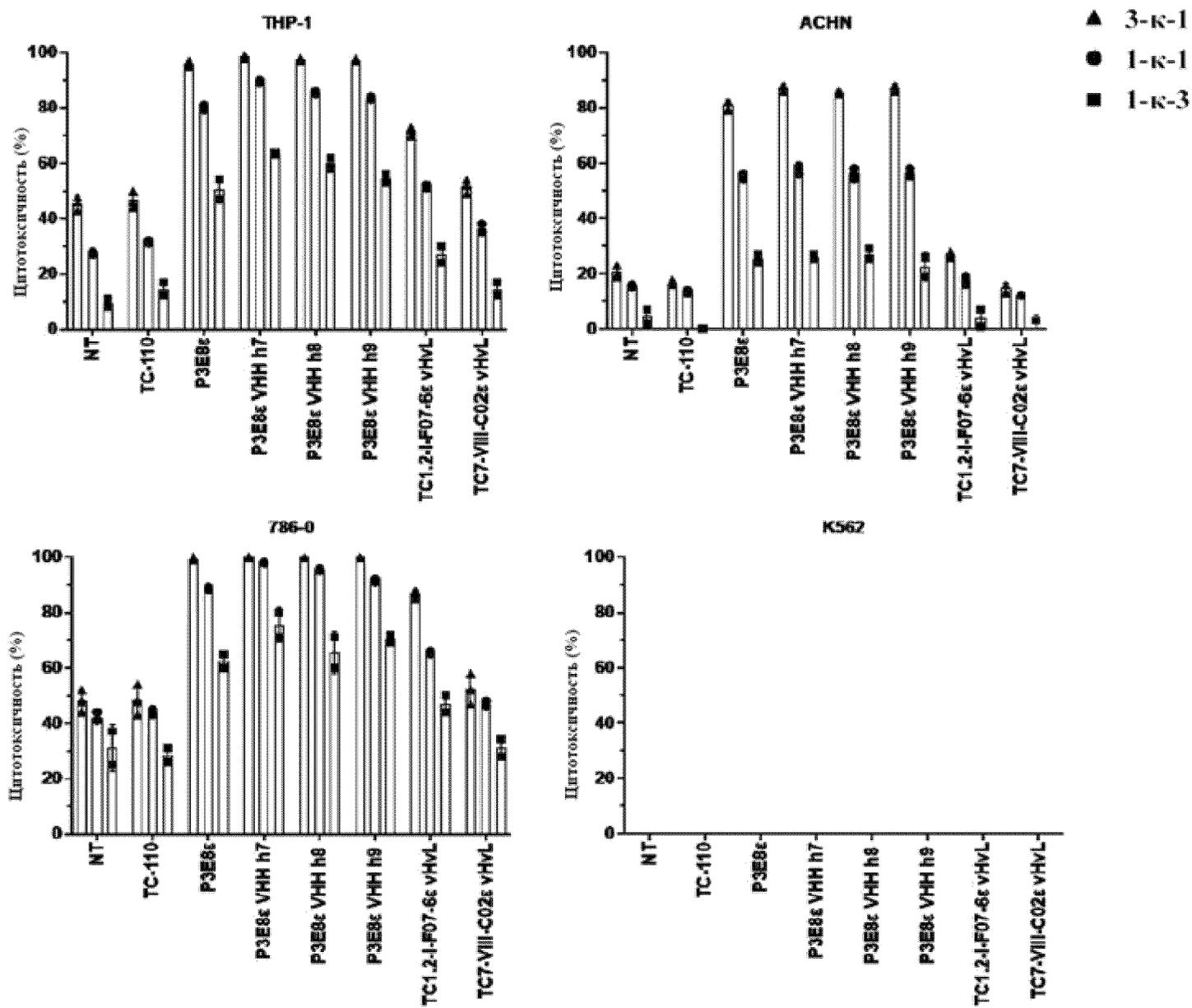
# TRuC и CD69



82/118

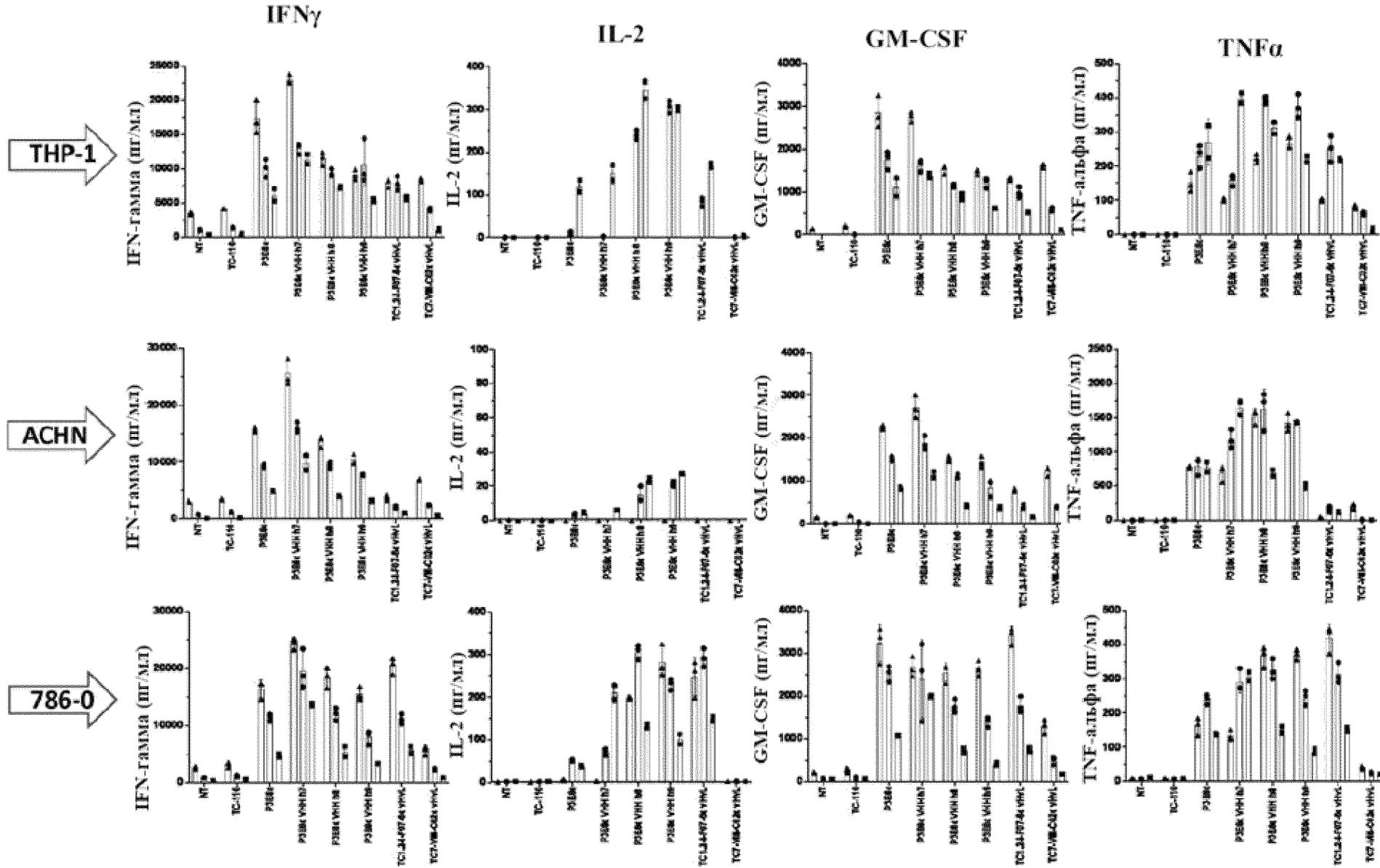
ФИГ. 55

# Результаты: Цитотоксичность через 24 ч

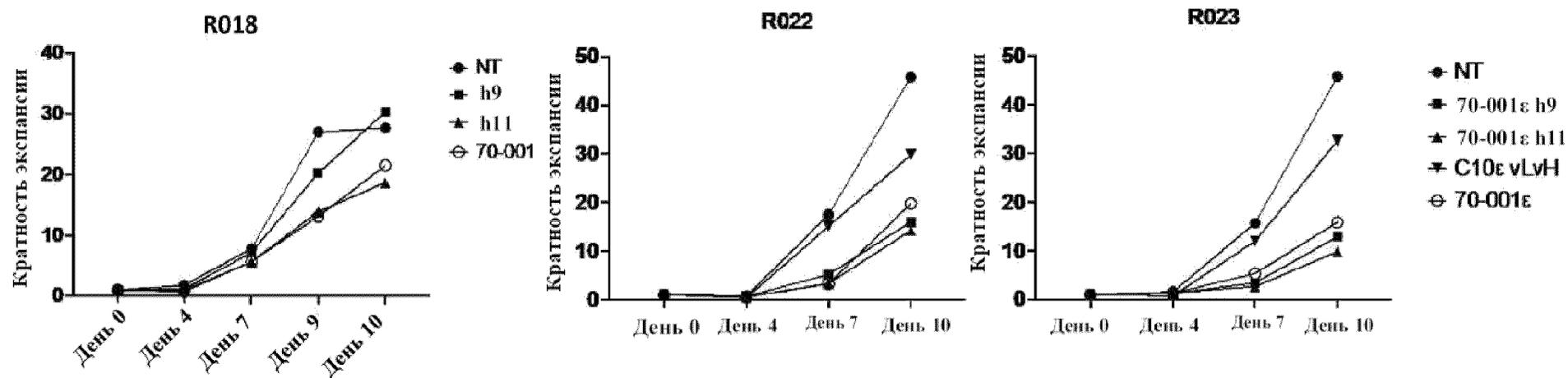


ФИГ. 56

# Результаты: Продукция цитокинов



## Экспансия гуманизированных TRuS VHN 70-001 в первичных Т-клетках



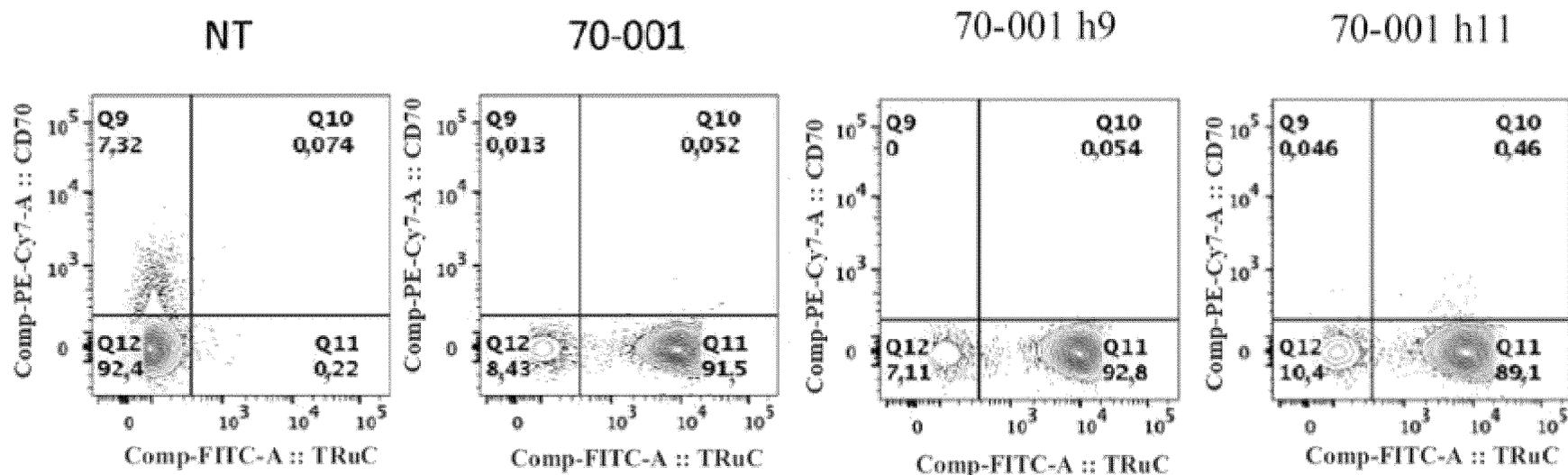
85/118

ФИГ. 57

# Экспрессия TRuC VHH 70-001 в первичных клетках

R018

анти-  
VHH

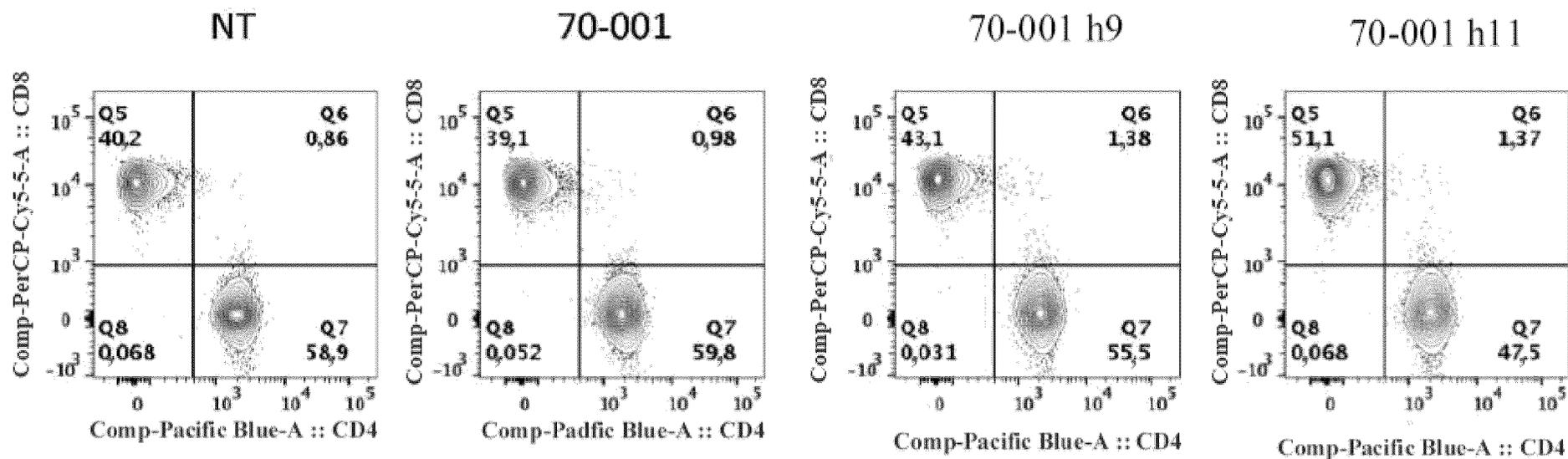


86/118

ФИГ. 58

# CD4/CD8

R018

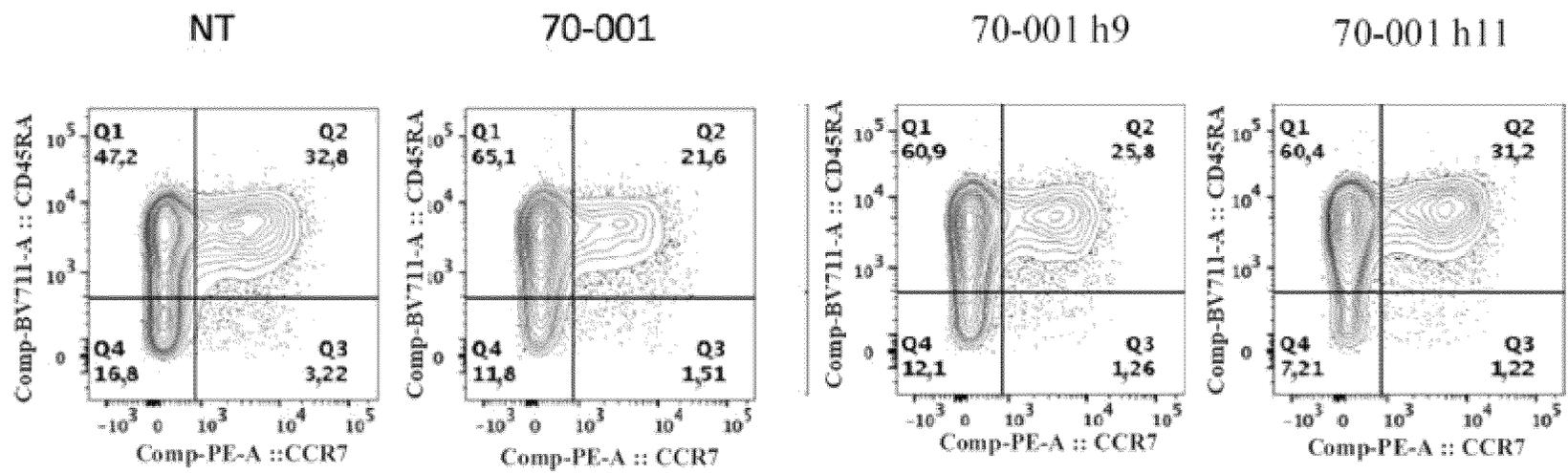


87/118

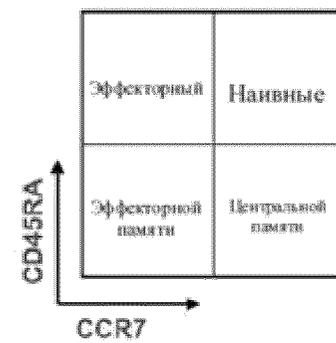
ФИГ. 59

# Фенотип памяти CD3+

R018



88/118

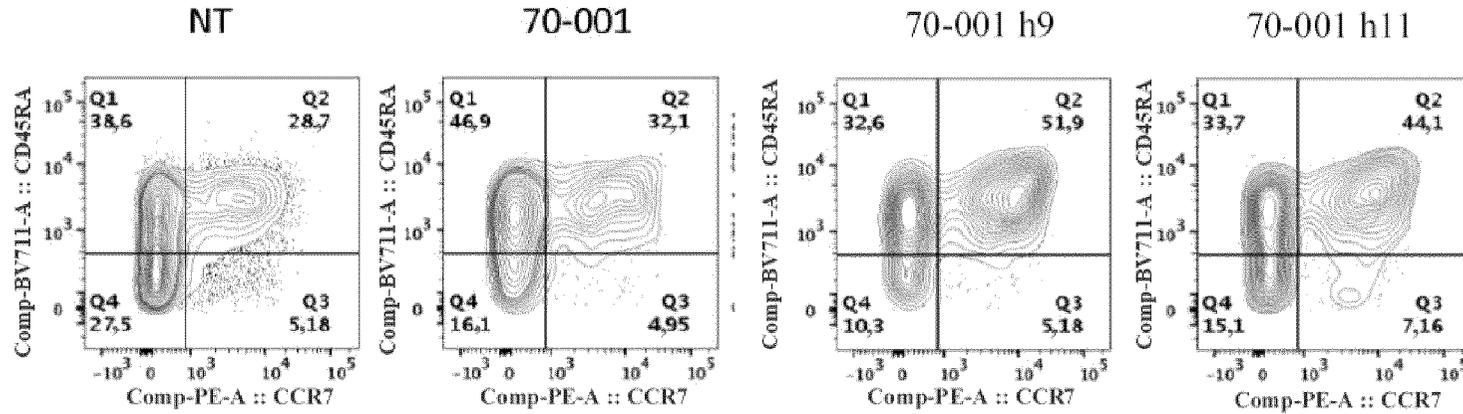


ФИГ. 60А

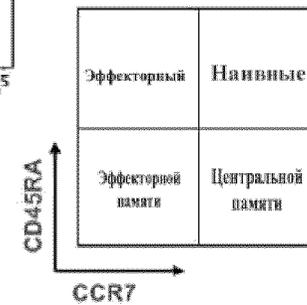
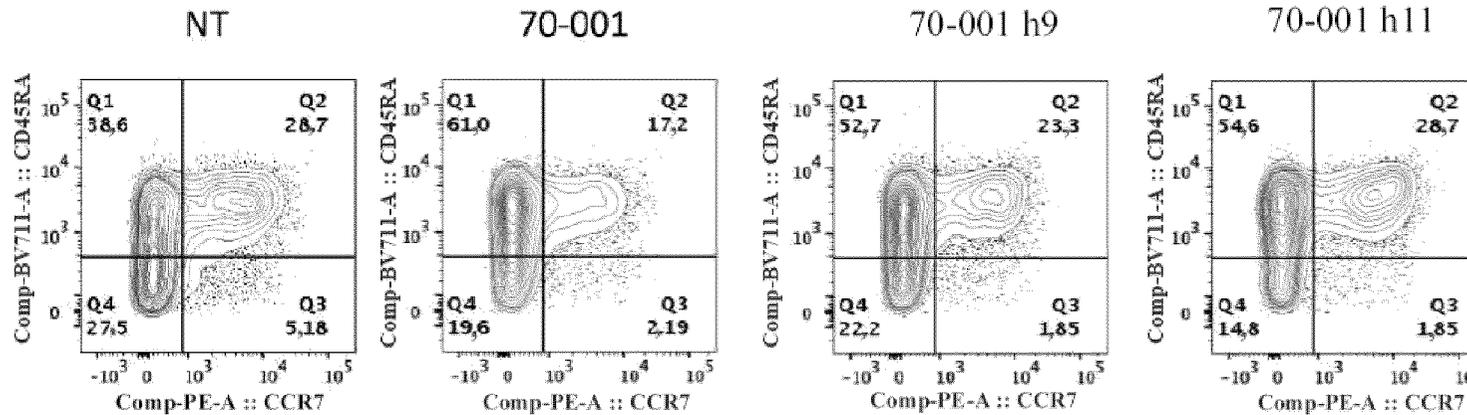
# Фенотип памяти CD4+

R018

TFP-

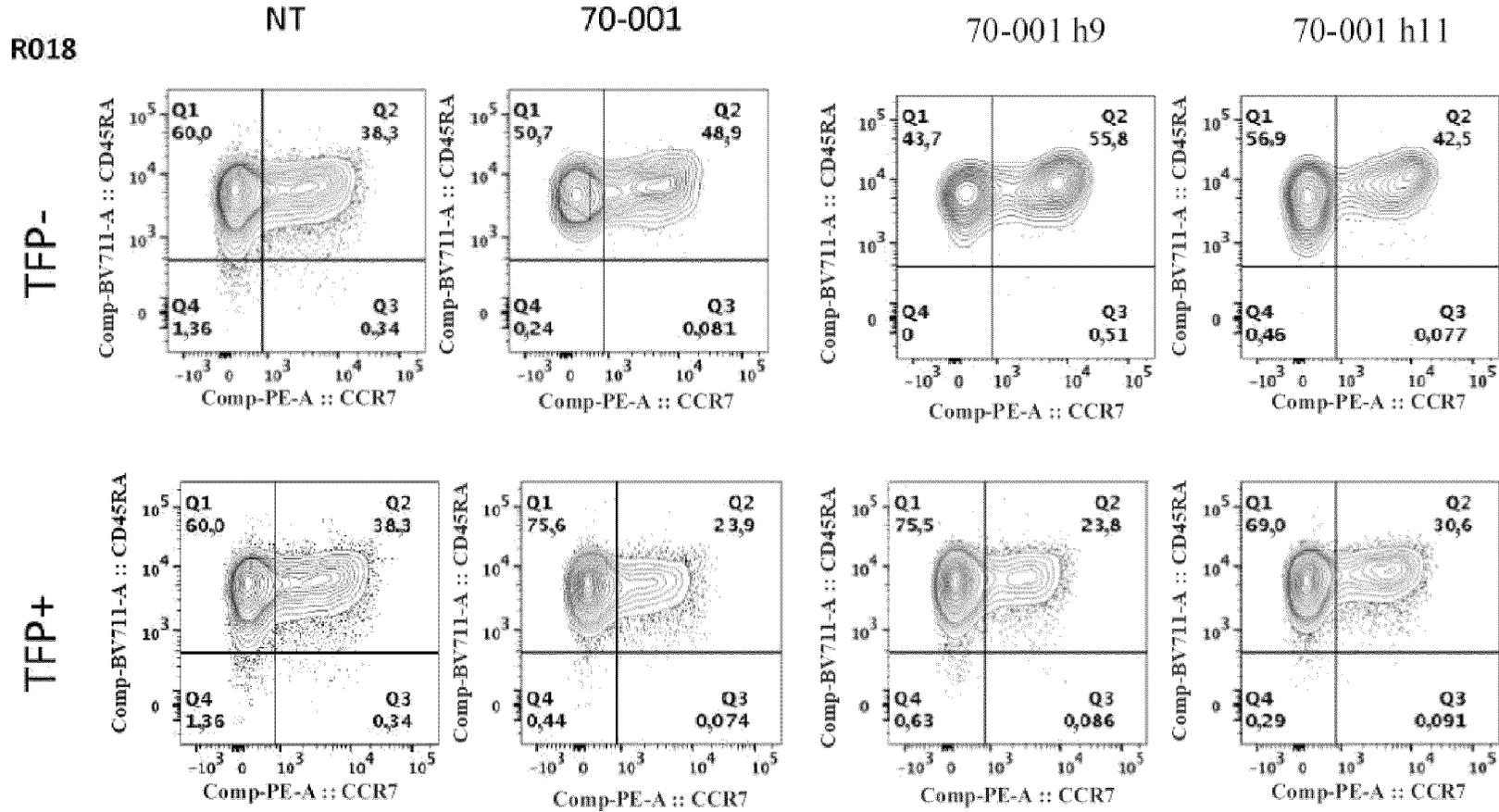


TFP+

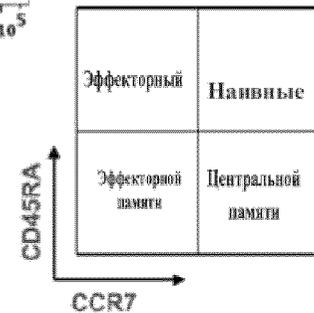


ФИГ. 60В

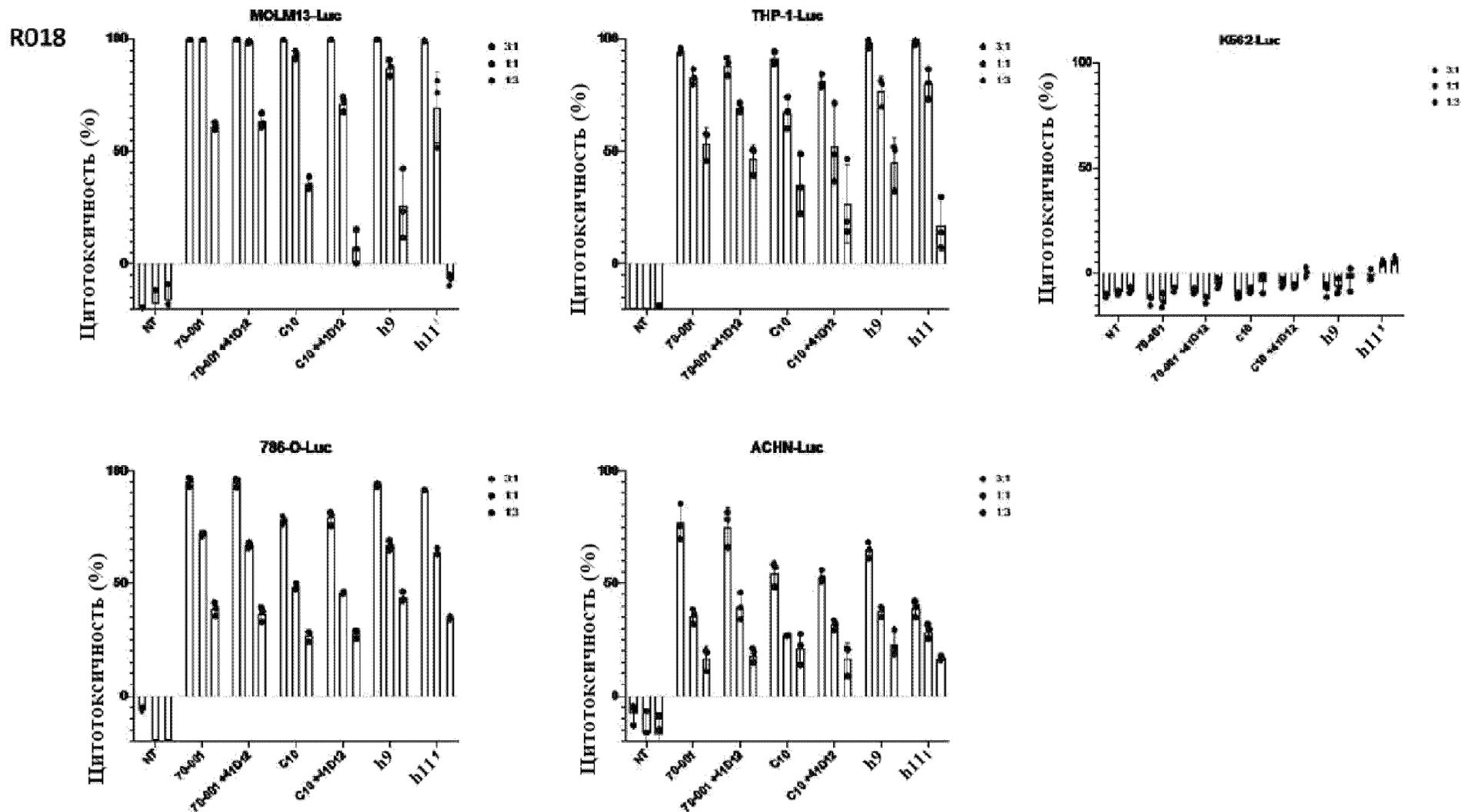
# Фенотип памяти CD8+



ФИГ. 60С

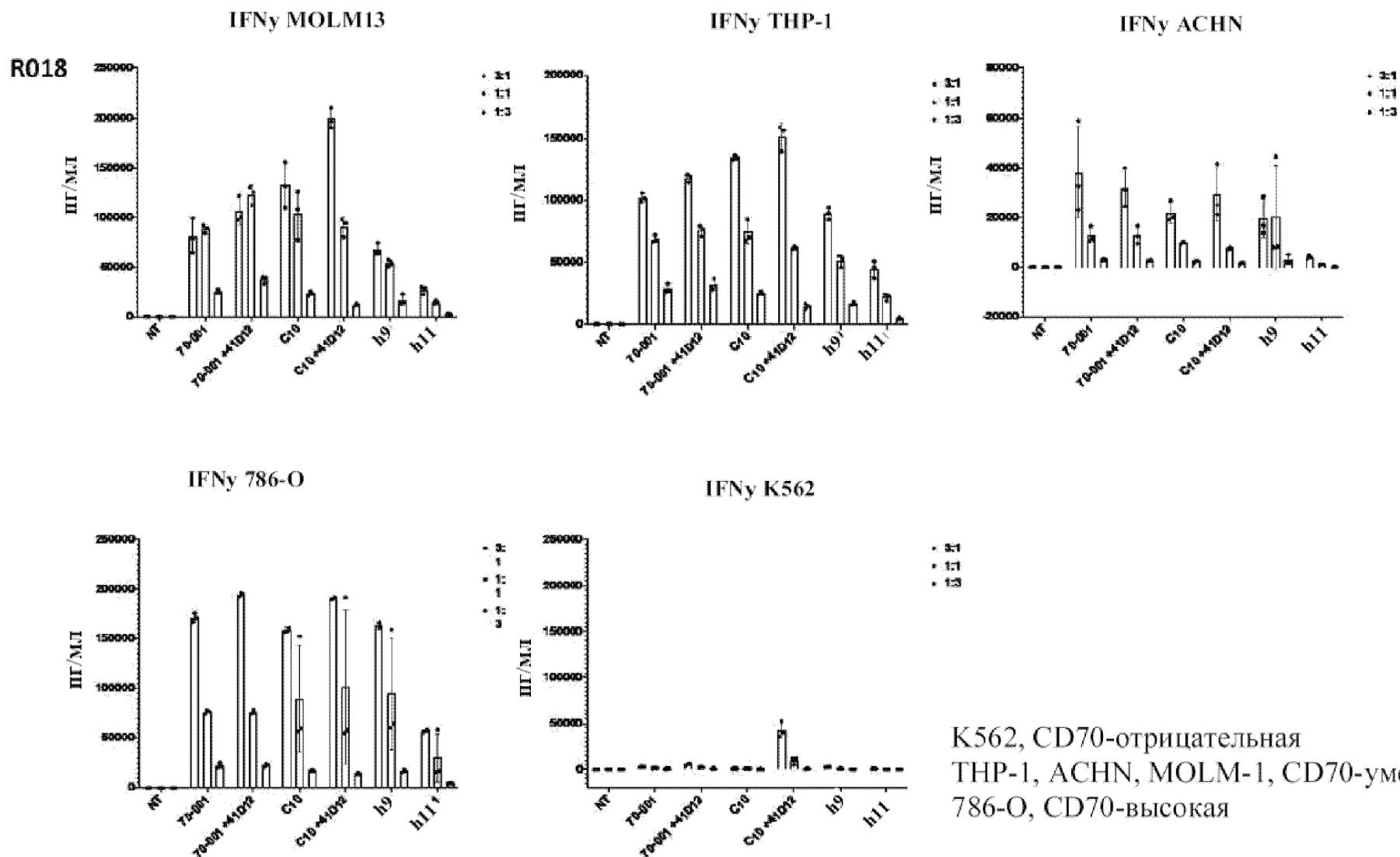


Устойчивое уничтожение наблюдается во всех CD70+ линиях клеток.



ФИГ. 61

# Продукция цитокинов в течение 24 часов

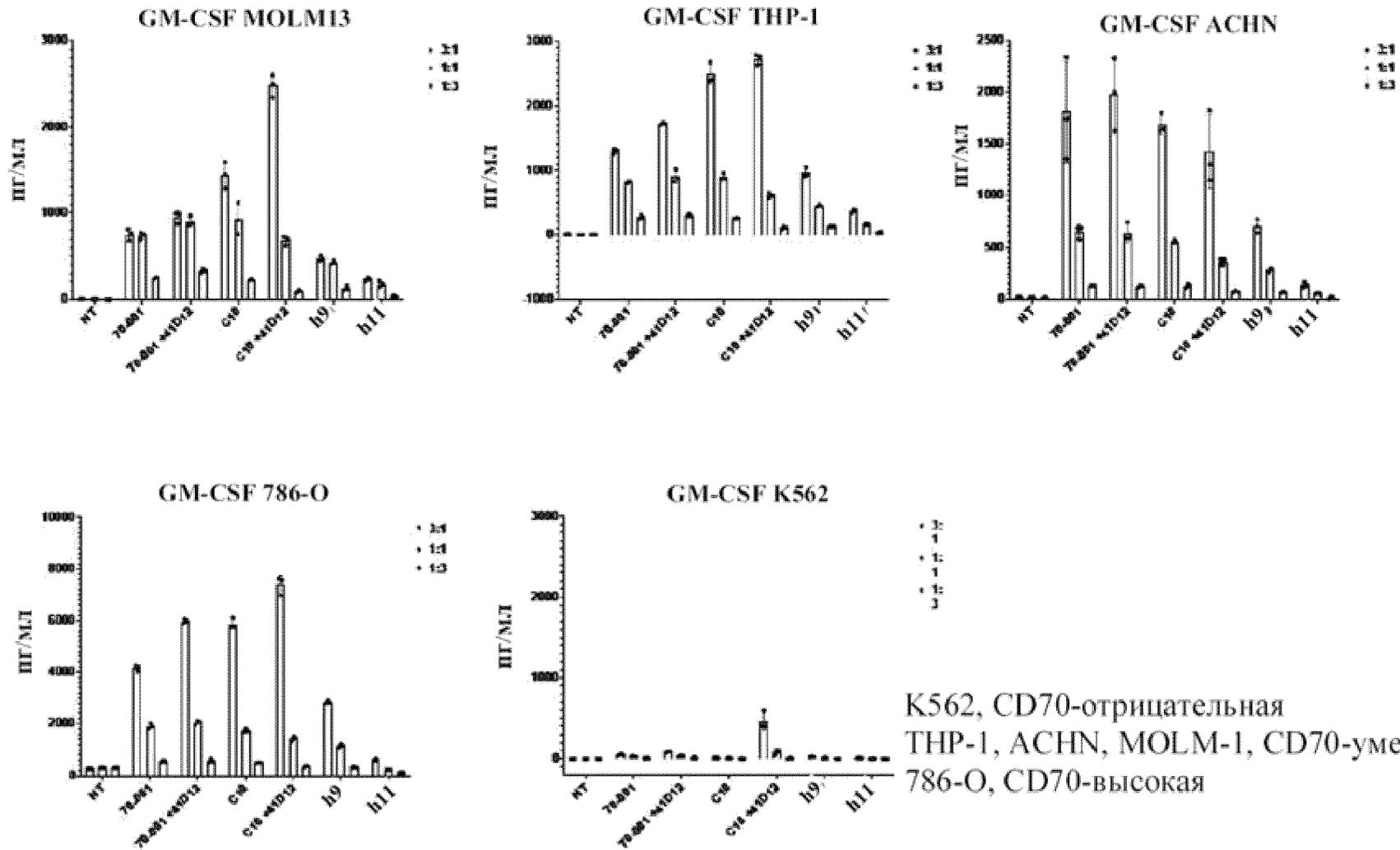


K562, CD70-отрицательная  
 THP-1, ACHN, MOLM-1, CD70-умеренная  
 786-O, CD70-высокая

ФИГ. 62А

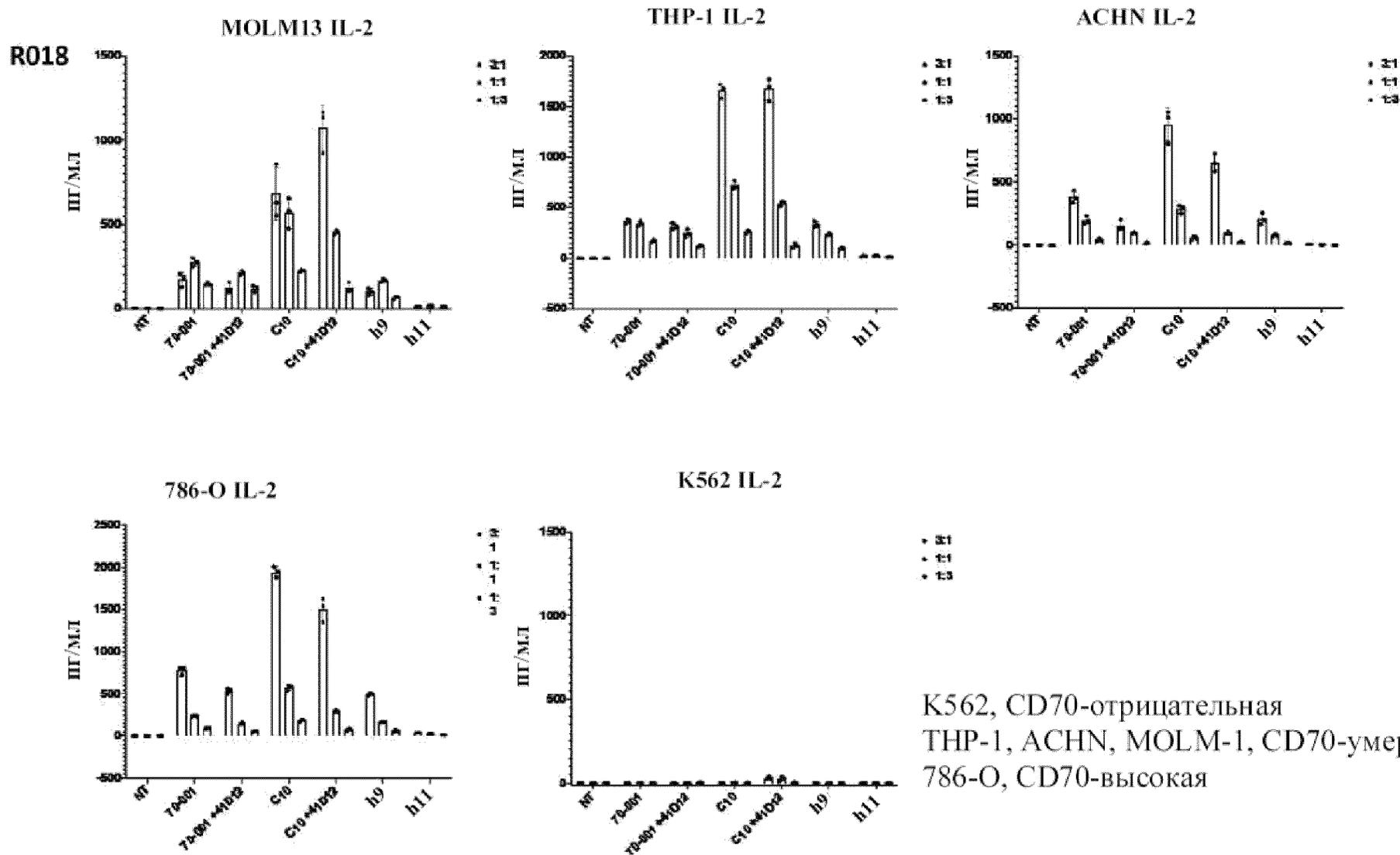
# Продукция цитокинов в течение 24 часов

R018



ФИГ. 62В

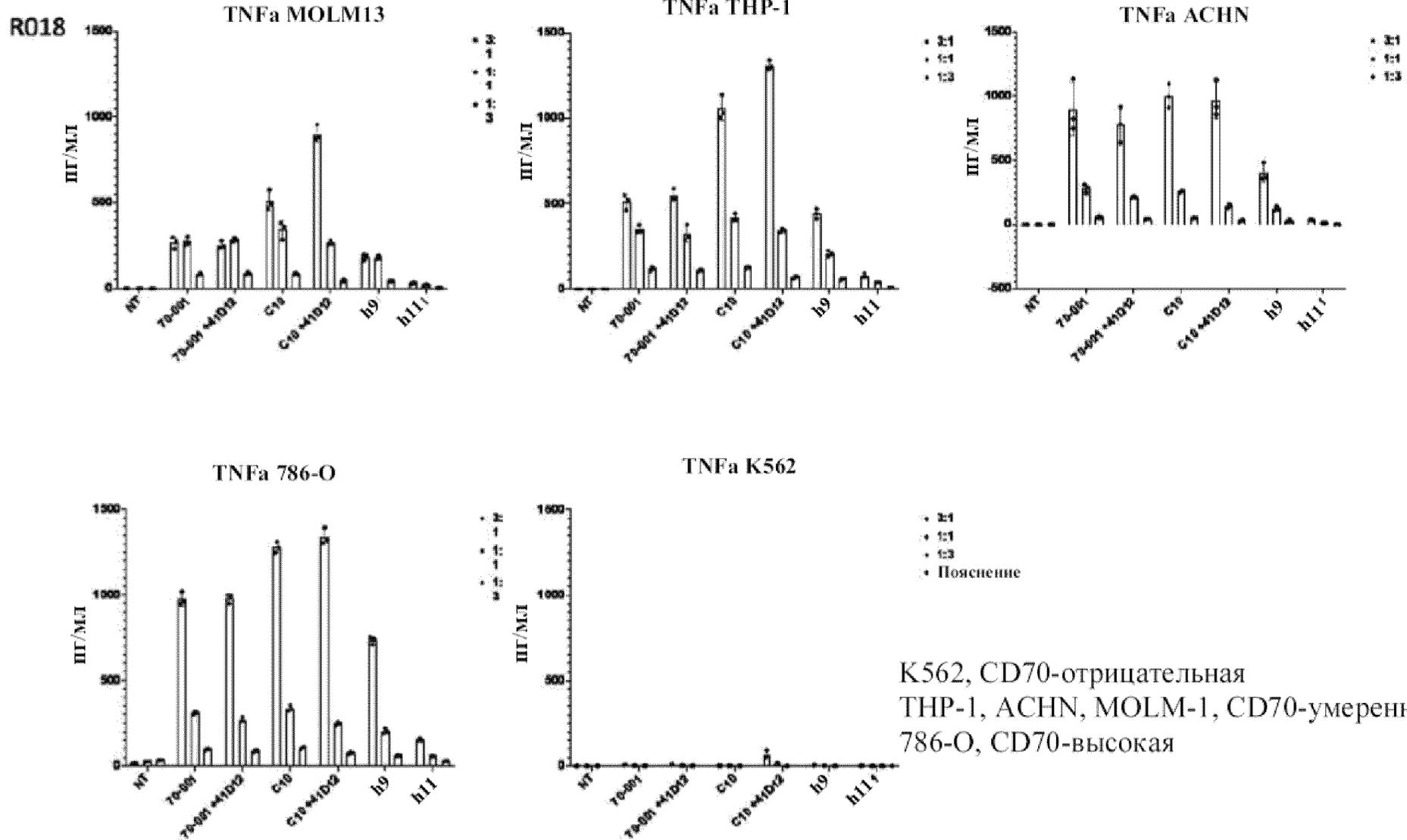
# Продукция цитокинов в течение 24 часов



K562, CD70-отрицательная  
 THP-1, ACHN, MOLM-1, CD70-умеренная  
 786-O, CD70-высокая

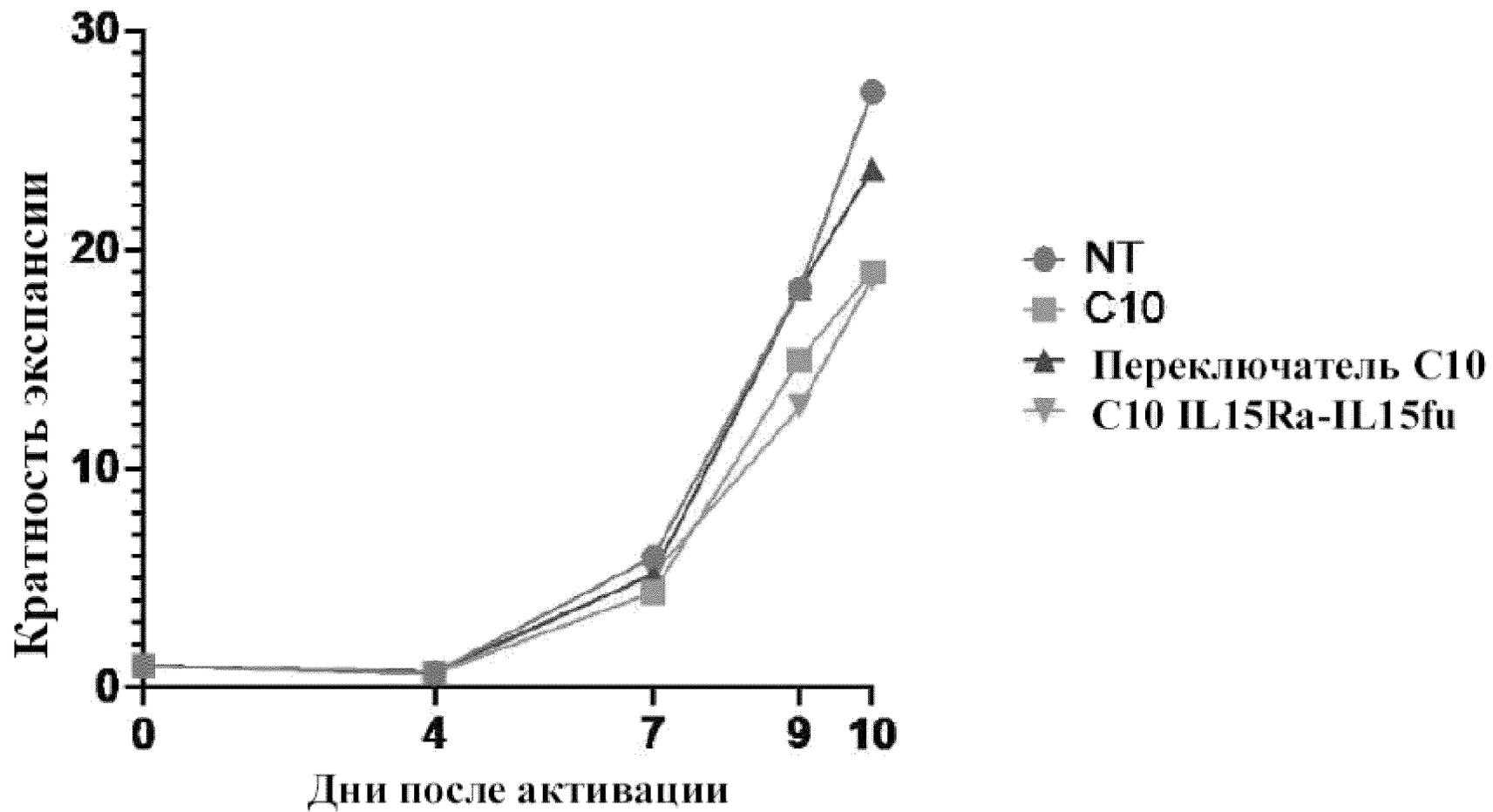
ФИГ. 62С

# Продукция цитокинов в течение 24 часов



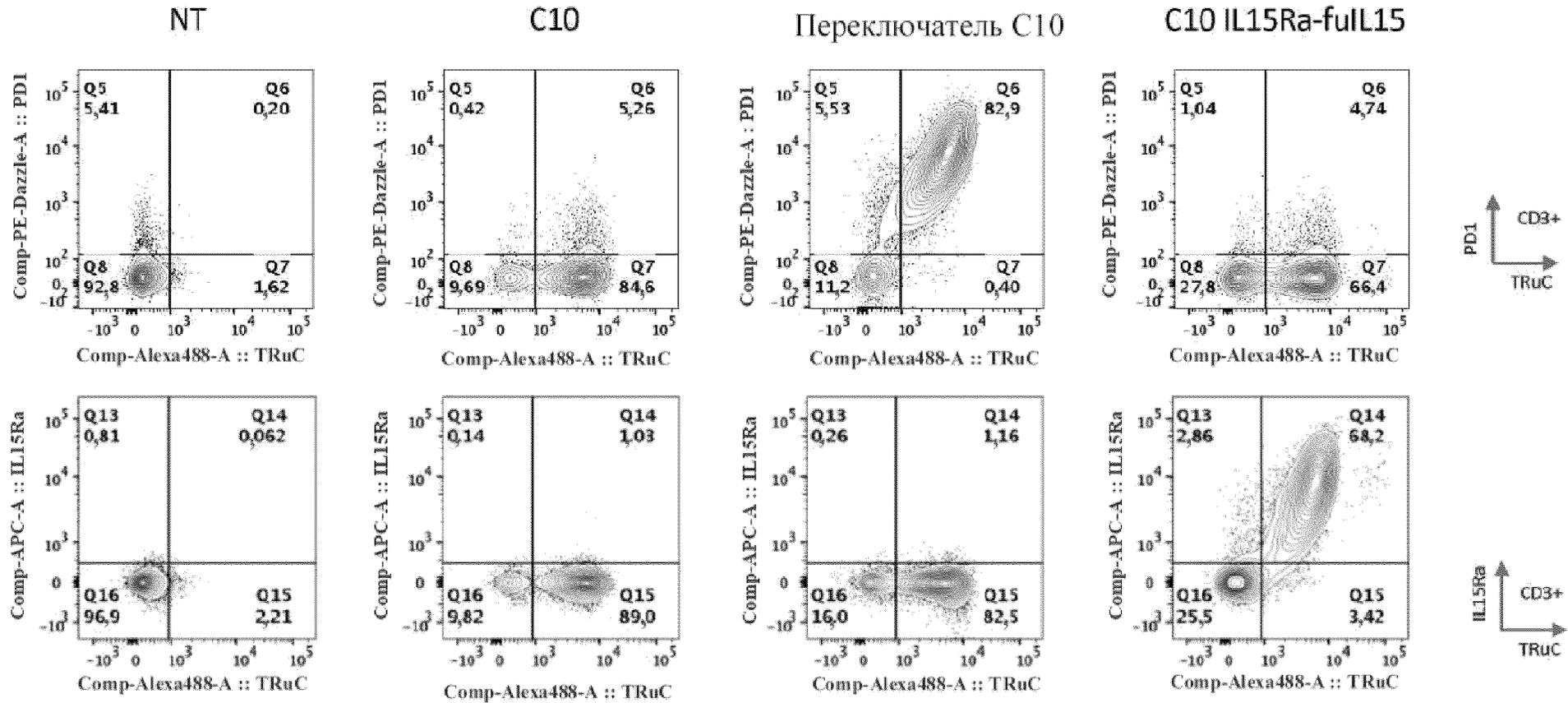
K562, CD70-отрицательная  
 THP-1, ACHN, MOLM-1, CD70-умеренная  
 786-O, CD70-высокая

ФИГ. 62D



ФИГ. 63

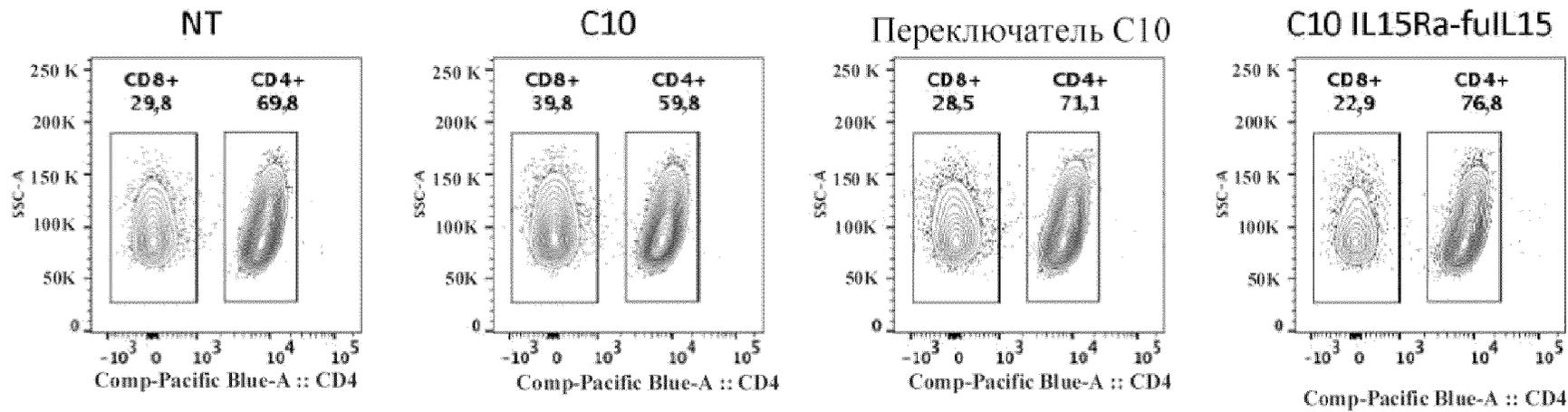
# Трансдукция



97/118

ФИГ. 64

# CD4+ Т-клетки



samples\_NT\_A01.fcs  
CD3+  
24061

samples\_C10\_A02.fcs  
CD3+  
20681

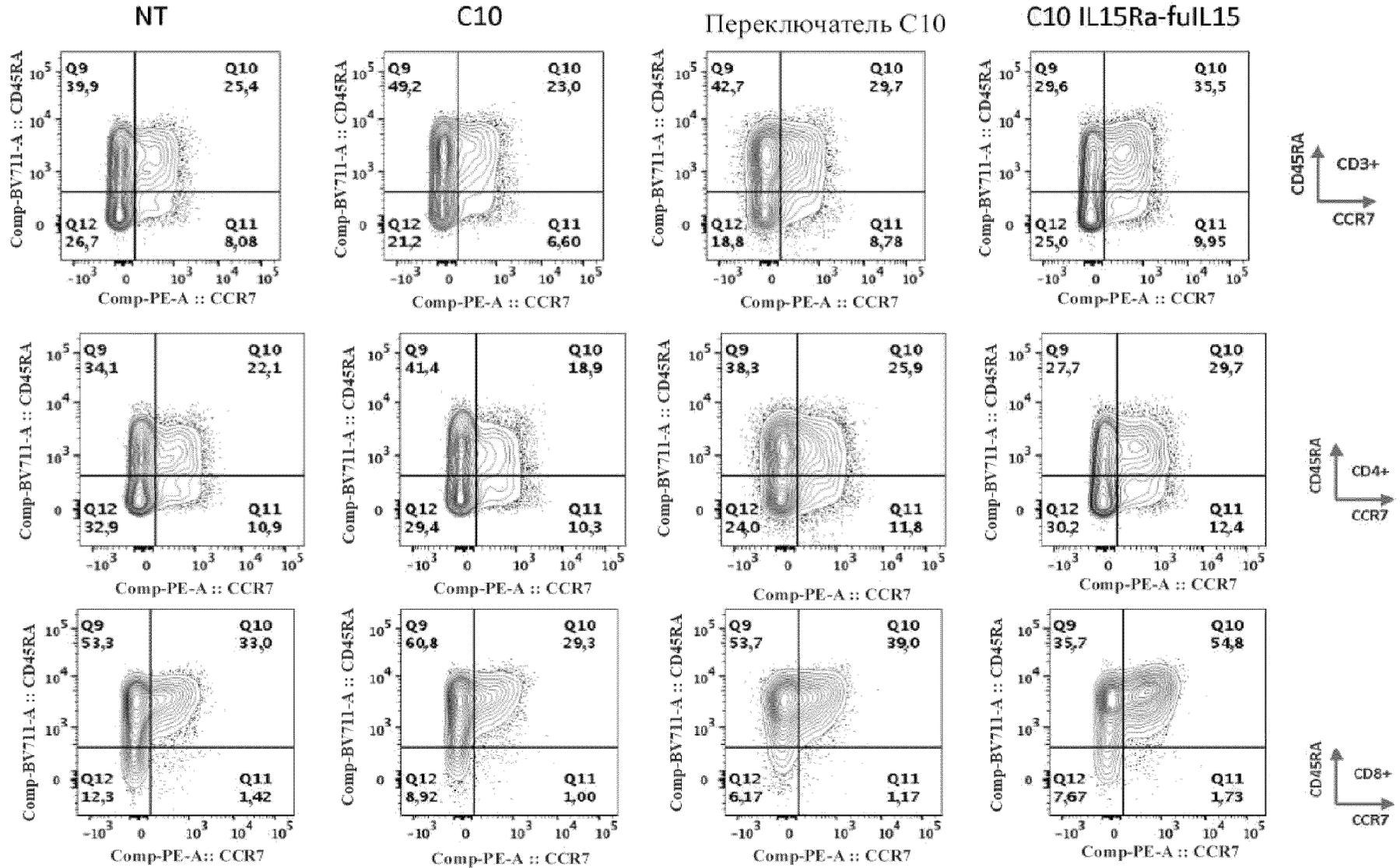
samples\_C10 Switch\_A03.fcs  
CD3+  
21493

samples\_C10 mIL15\_A04.fcs  
CD3+  
20855

SSC-A  
CD3+  
CD4  
98/118

ФИГ. 65

# Фенотип памяти

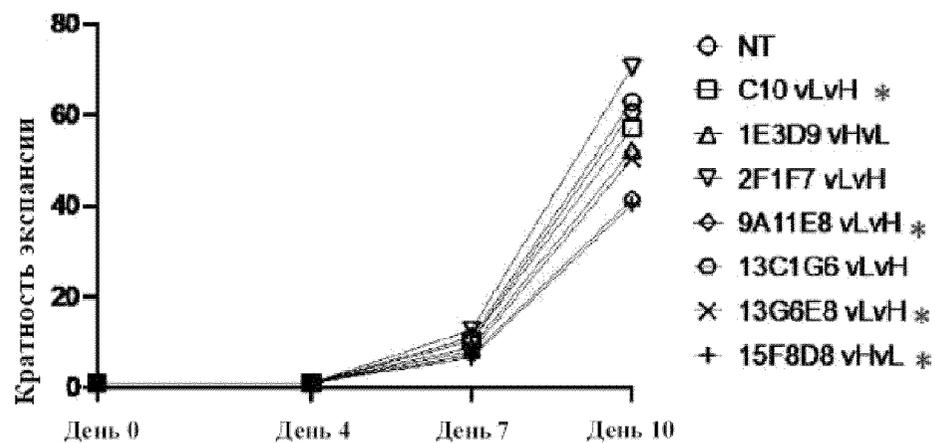


99/118

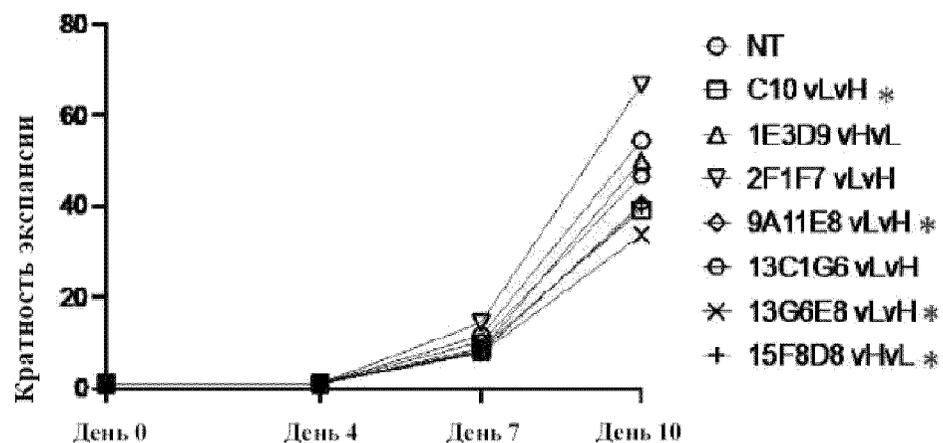
ФИГ. 66

# Экспансия Т-клеток с TRuC CD70

Т-клетки с TRuC CD70 от R17, черно-белое



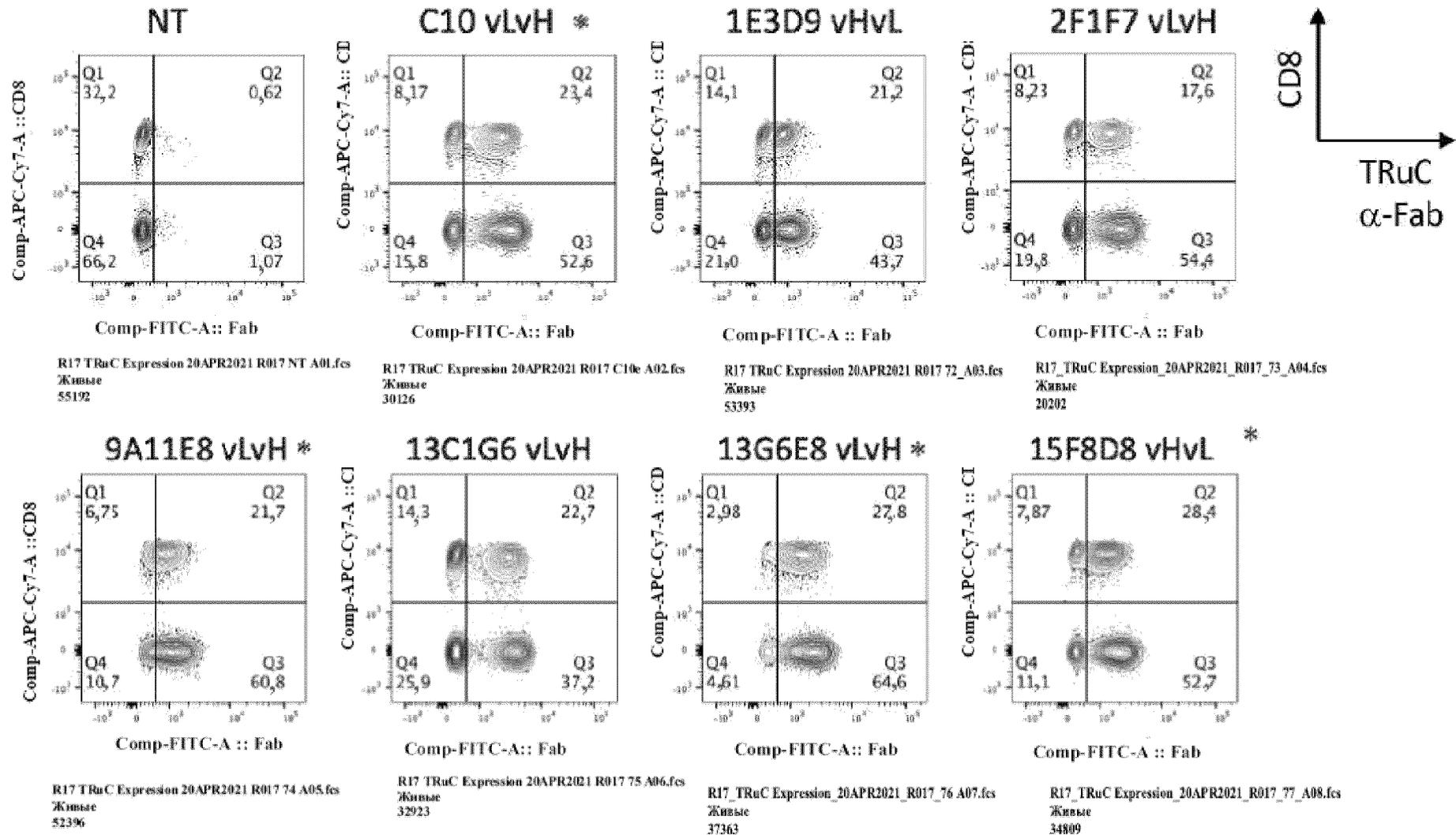
Т-клетки с TRuC CD70 от R22, черно-белое



\* TRuC Т-клетки продемонстрировали фратрицид и цитотоксичность.

ФИГ. 67

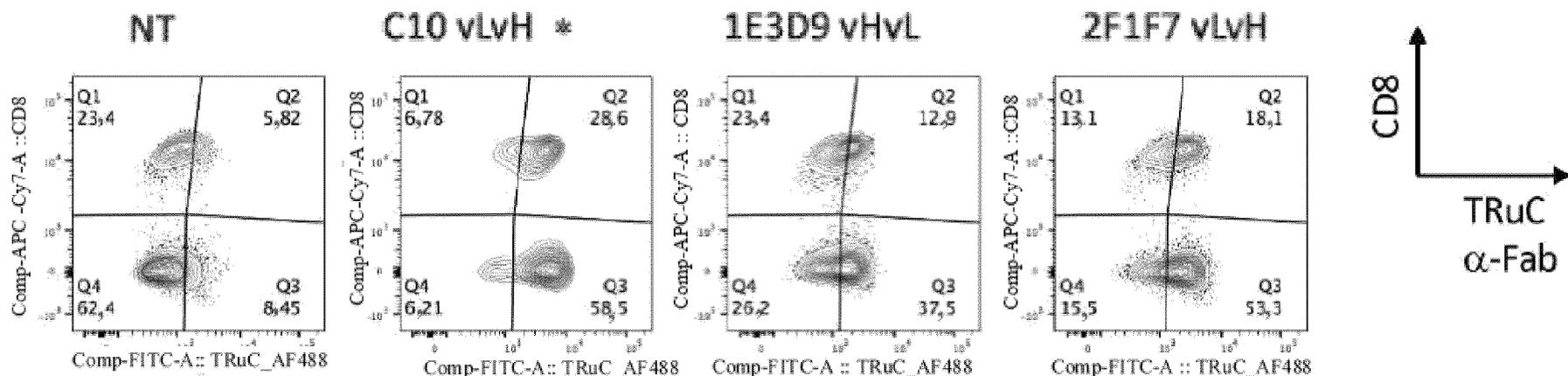
# Экспрессия TRuC CD70 (донор R17)



101/118

ФИГ. 68А

# Экспрессия TRuC CD70 (донор R22)

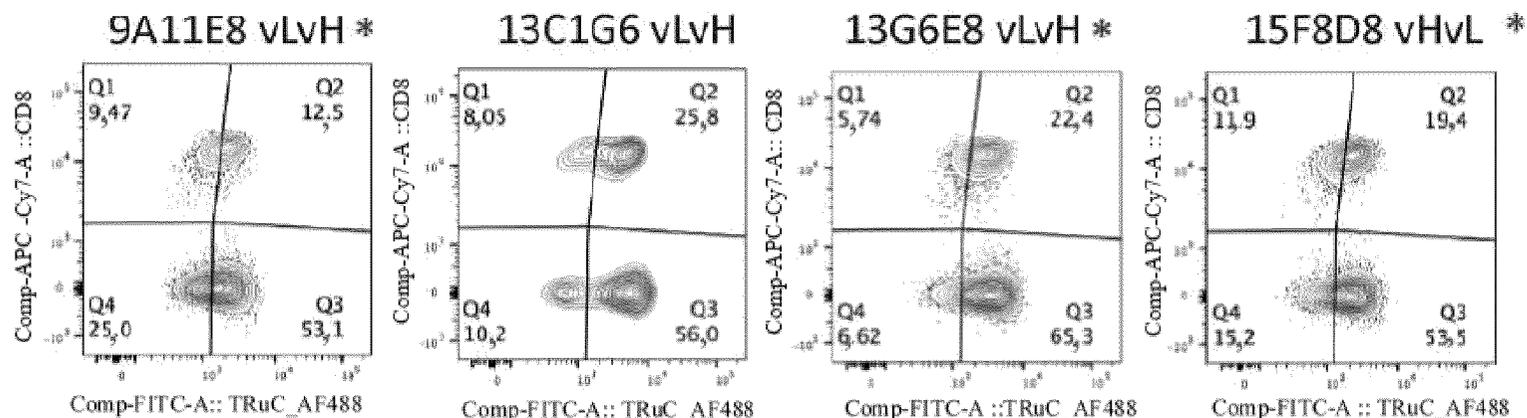


R22 TRuC Expression 28APR2021 R017 NT  
A01.fcs  
Живые  
72946

R22 TRuC Expression 28APR2021 R017  
C10e A02.fcs  
Живые  
60015

R22 TRuC Expression 28APR2021 R017  
72\_A03.fcs  
Живые  
57625

R22 TRuC Expression 28APR2021 RD17 73\_A04.fcs  
Живые  
79573



R22 TRuC  
Expression\_28APR2021\_R017\_74\_A05.fcs  
Живые  
81622

R22 TRuC Expression 28APR2021\_R017  
75 A06.fcs  
Живые  
72367

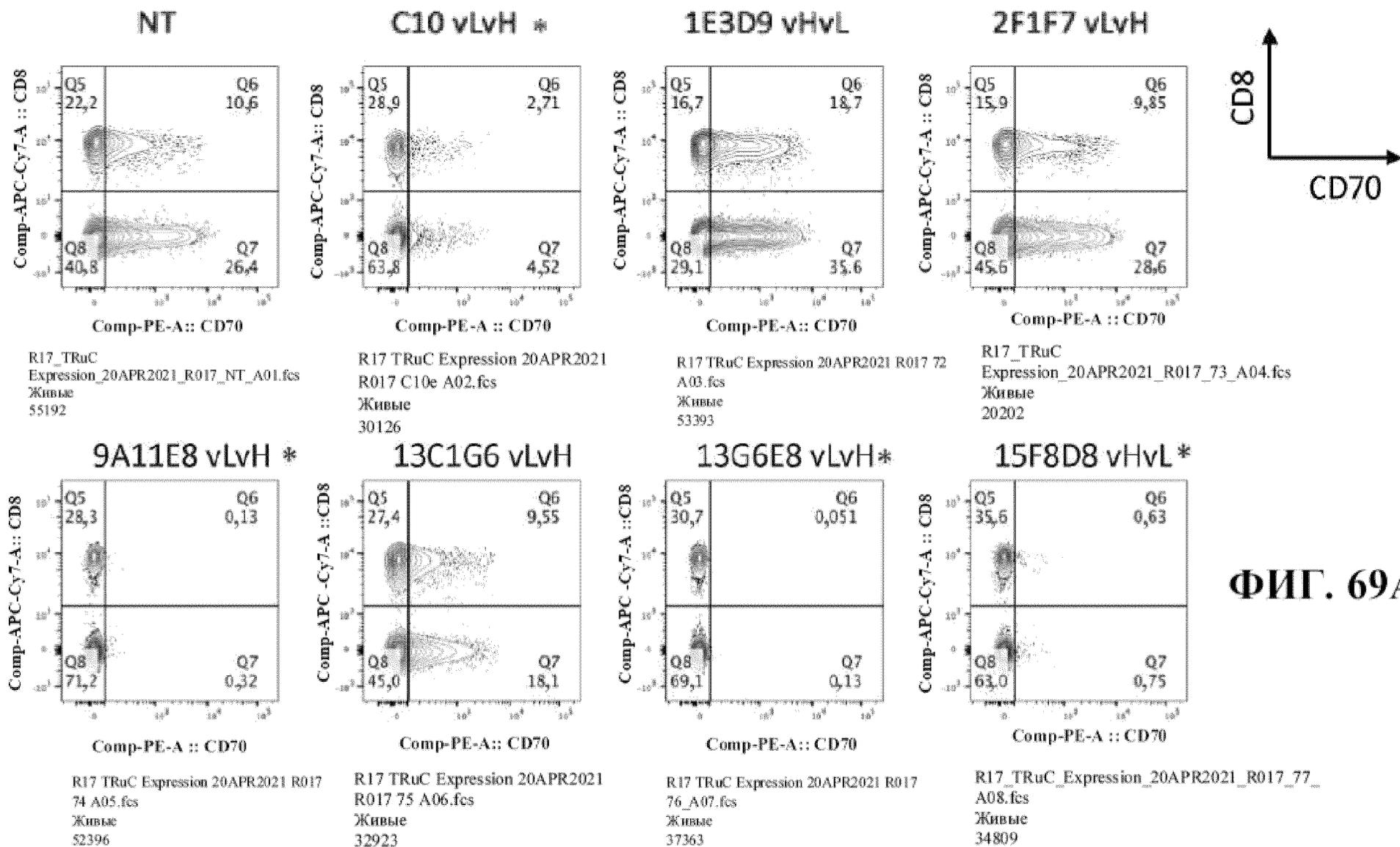
R22 TRuC  
Expression\_28APR2021\_R017\_76\_A07.fcs  
Живые  
70934

R22 TRuC Expression 28APR2021 R017 77 A08.fcs  
Живые  
72922

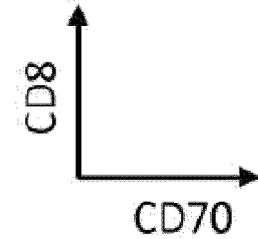
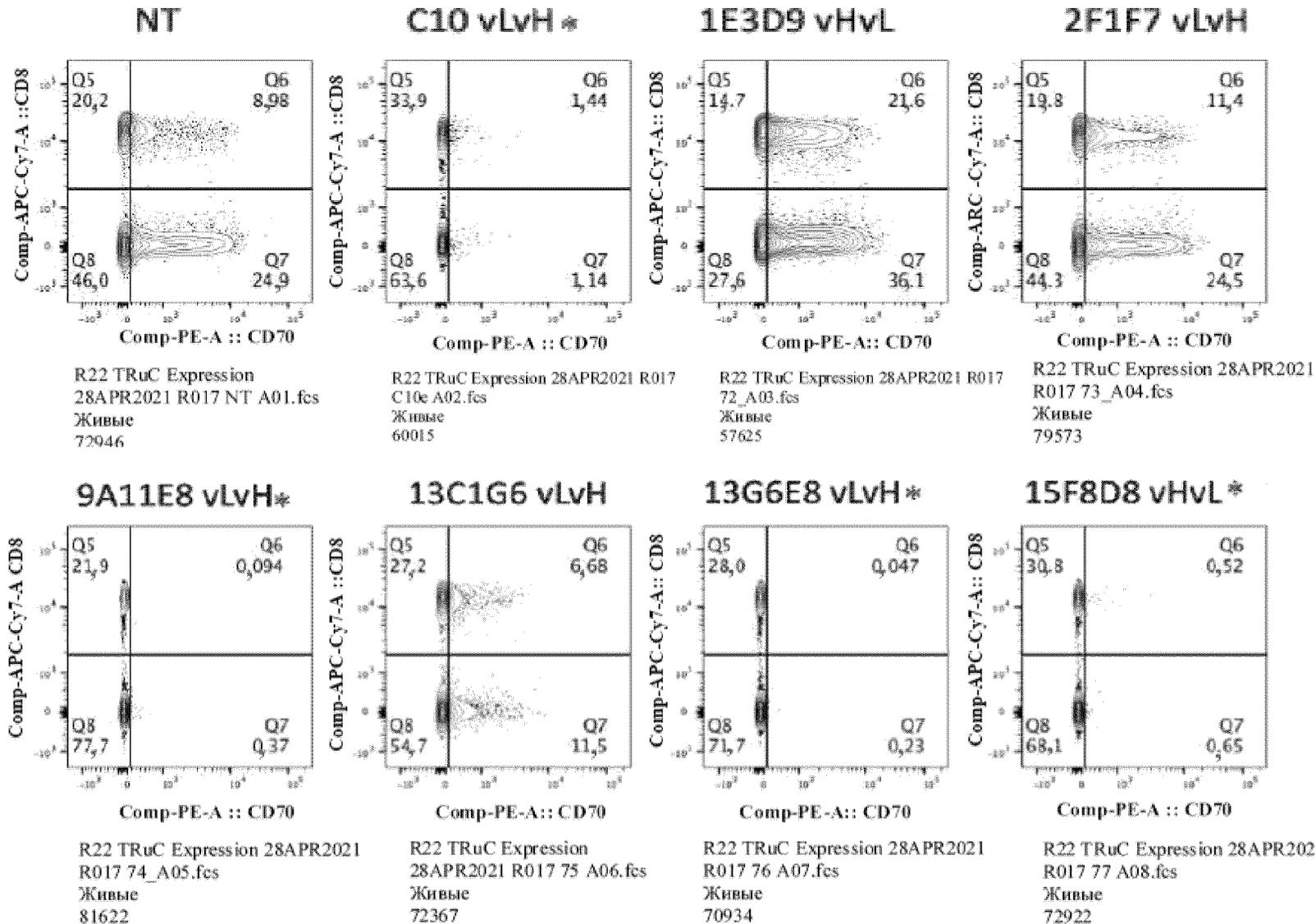
102/118

ФИГ. 68В

# Экспрессия CD70 (R17)



# Экспрессия CD70 (R22)

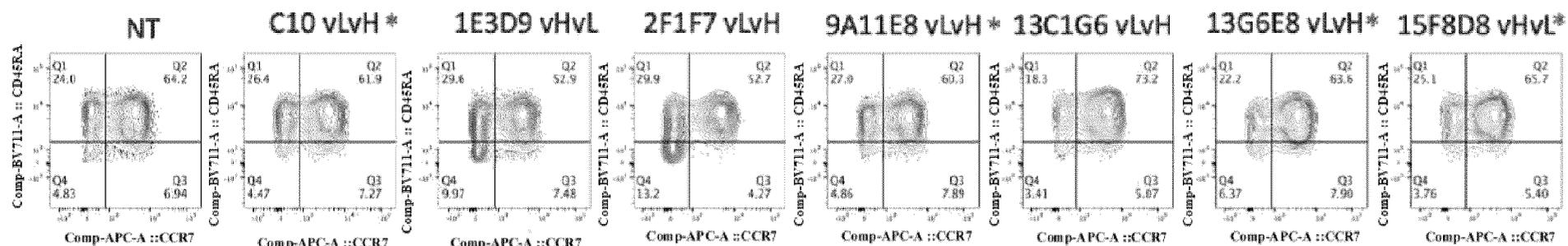


104/118

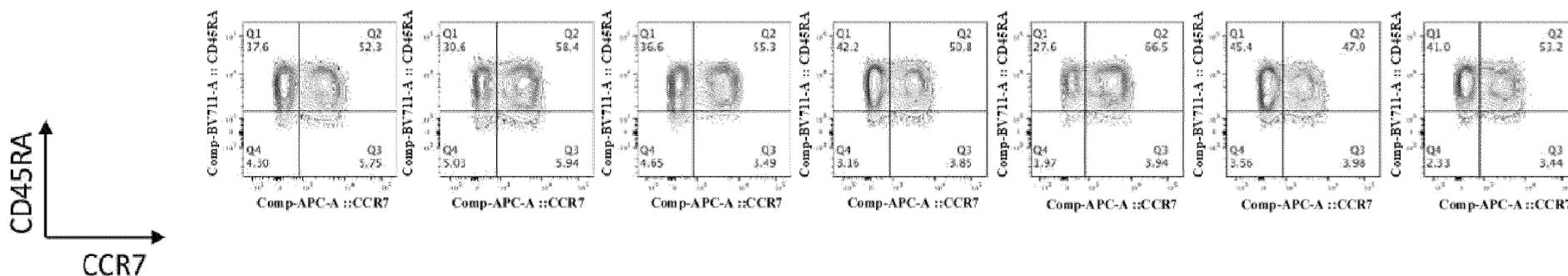
ФИГ. 69В

# Определение CD8 памяти/эффекторного фенотипа (R17)

TRuC-

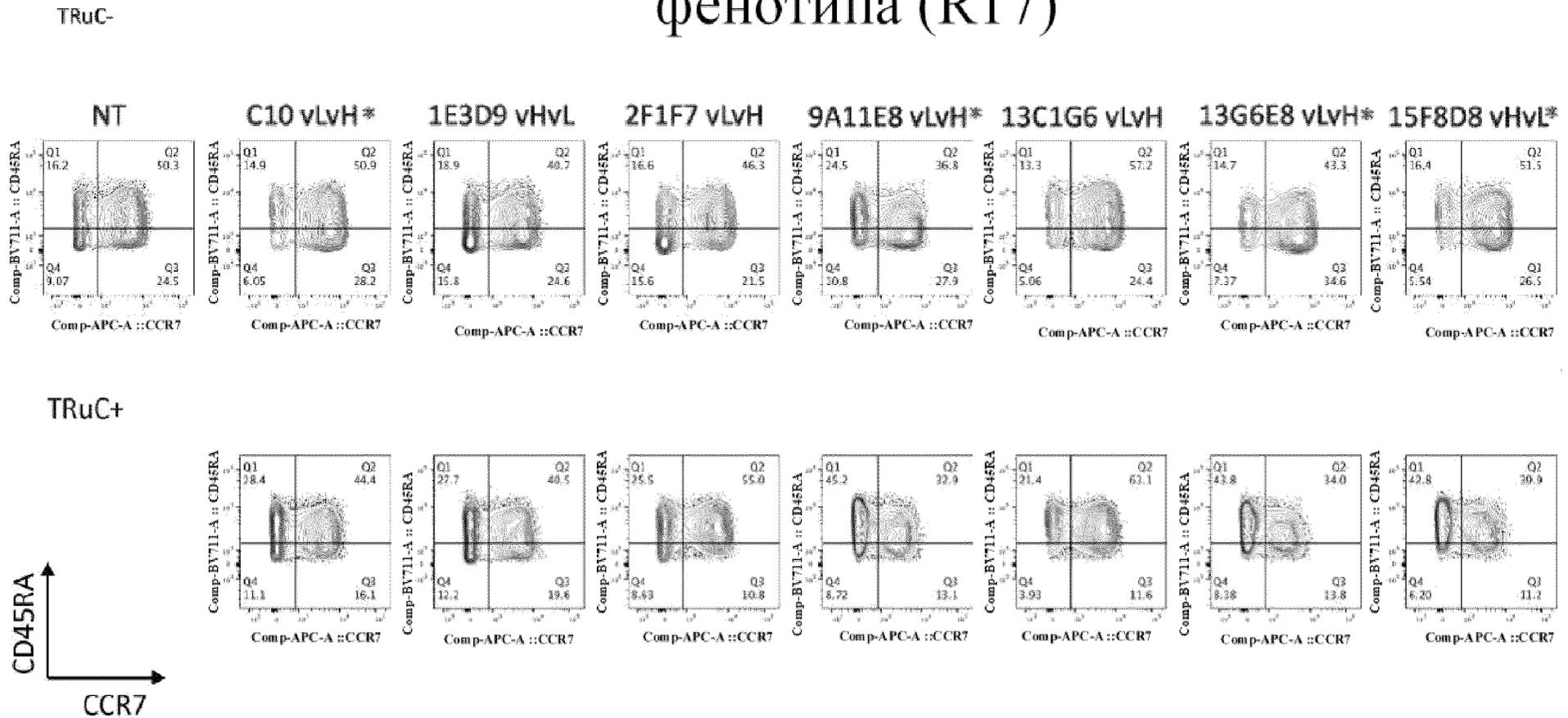


TRuC+



ФИГ. 70А

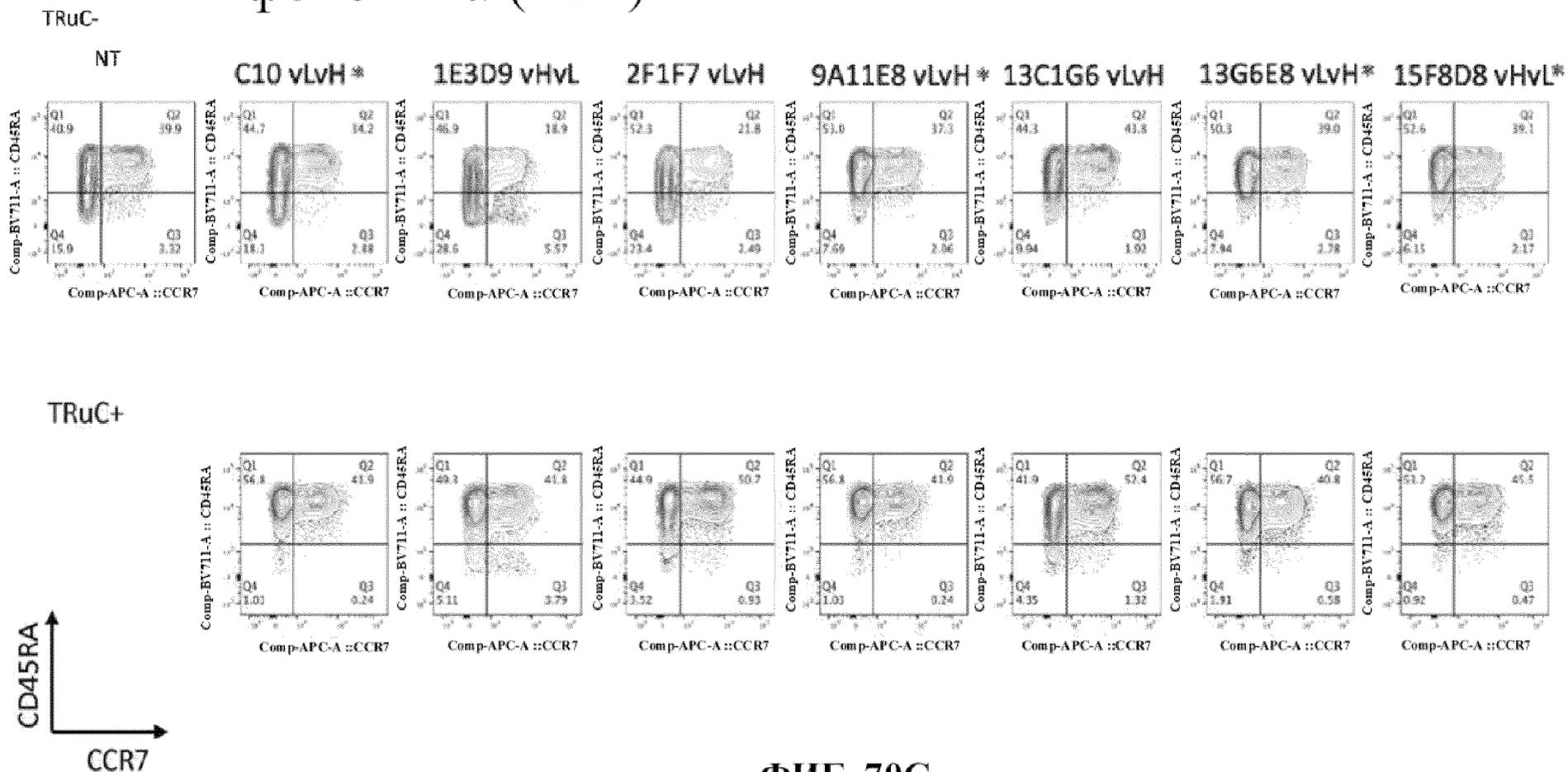
# Определение CD4 памяти/эффекторного фенотипа (R17)



106/118

ФИГ. 70В

# Определение CD8 памяти/эффекторного фенотипа (R22)

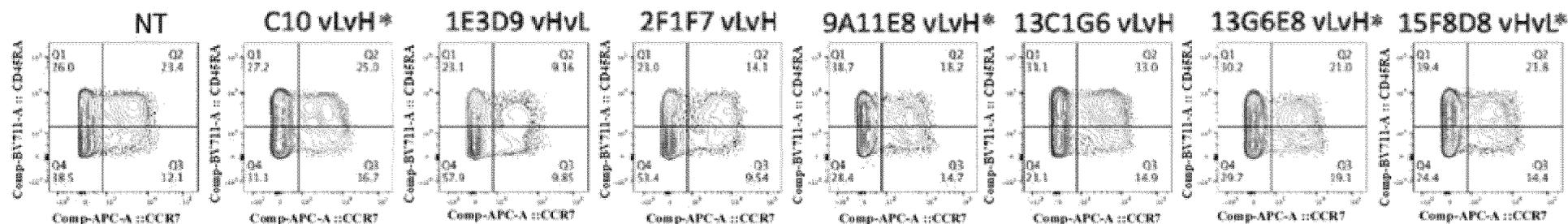


107/118

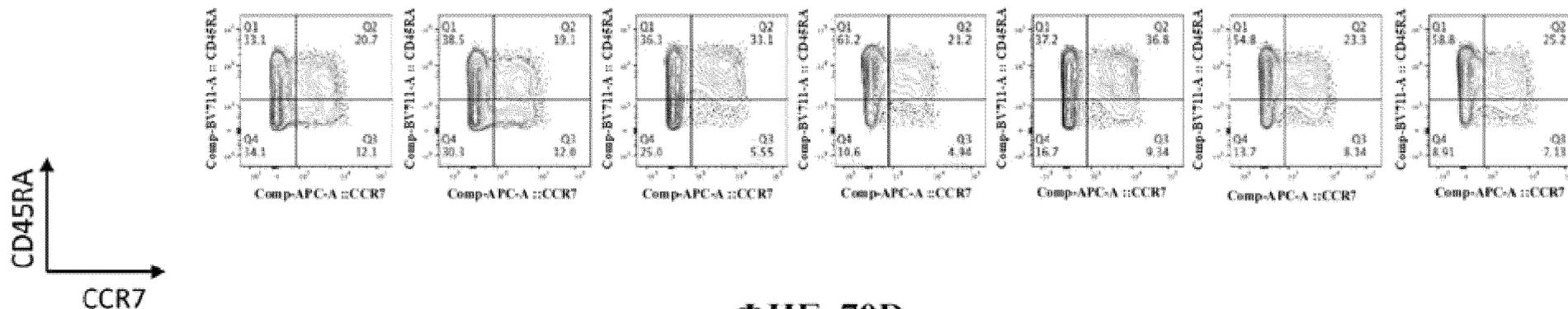
ФИГ. 70С

# Определение CD4 памяти/эффекторного фенотипа (R22)

TRuC-



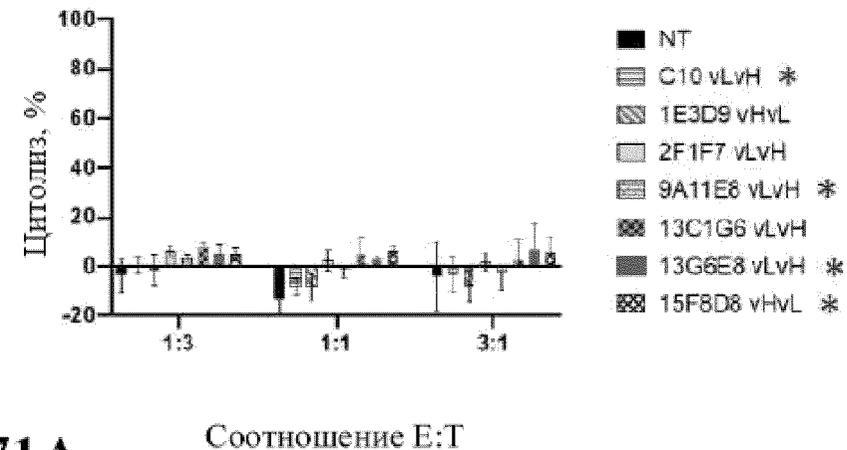
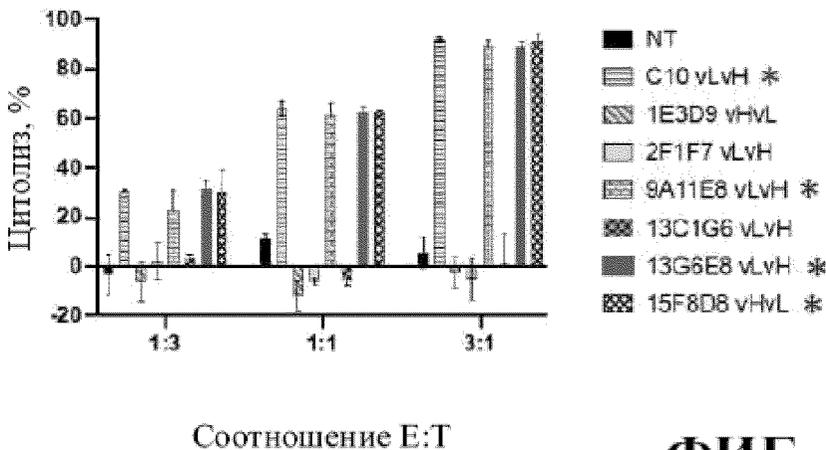
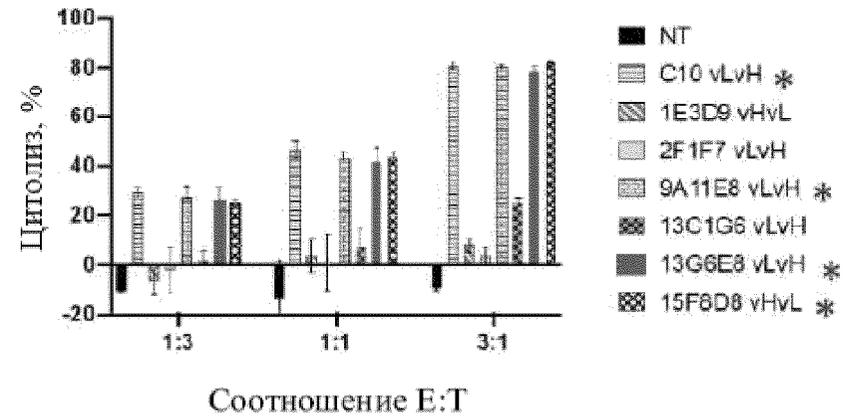
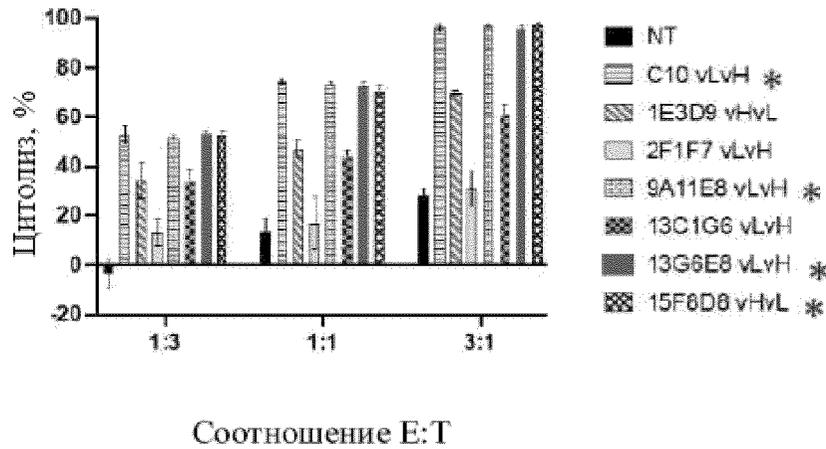
TRuC+



108/118

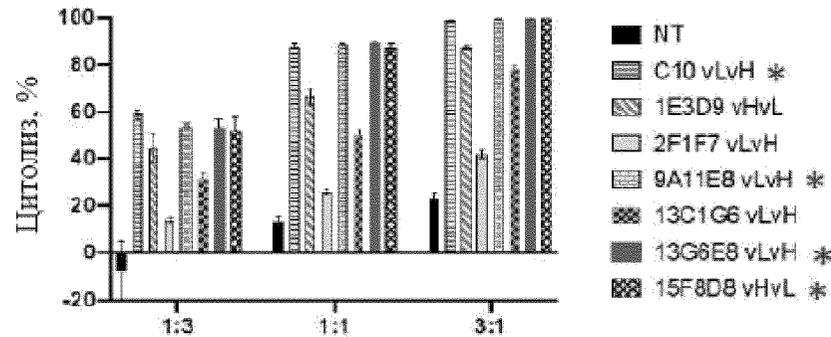
ФИГ. 70D

# Цитотоксичность Т-клеток с TRuС к CD70 (R17)



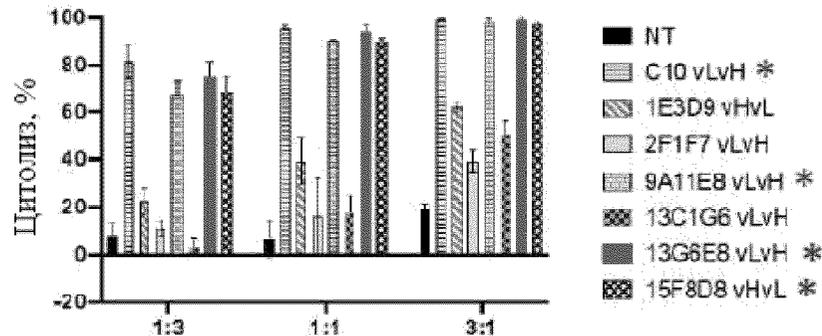
ФИГ. 71А

# Цитотоксичность Т-клеток с TRuС к CD70 (R22)



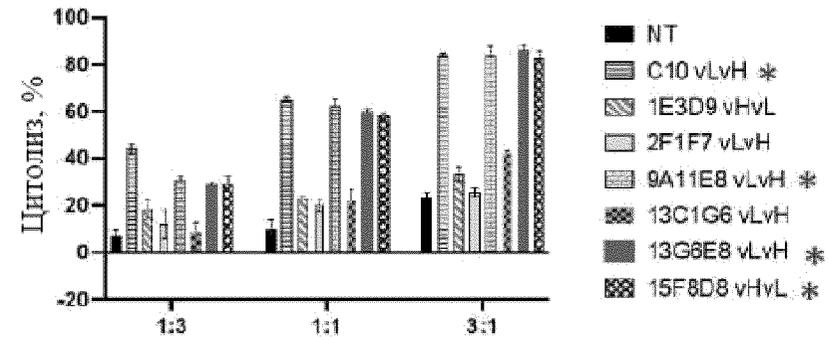
Соотношение E:T

R22 24ч THP1



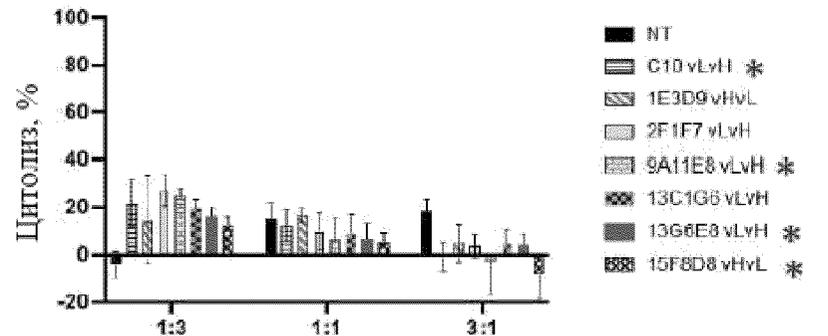
Соотношение E:T

ФИГ. 71В



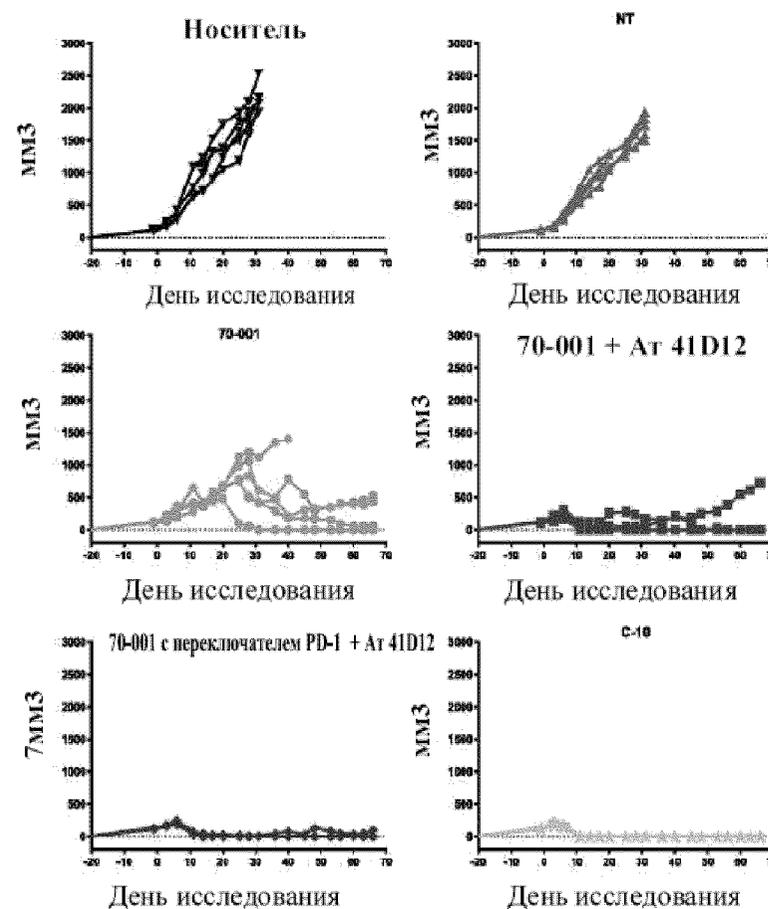
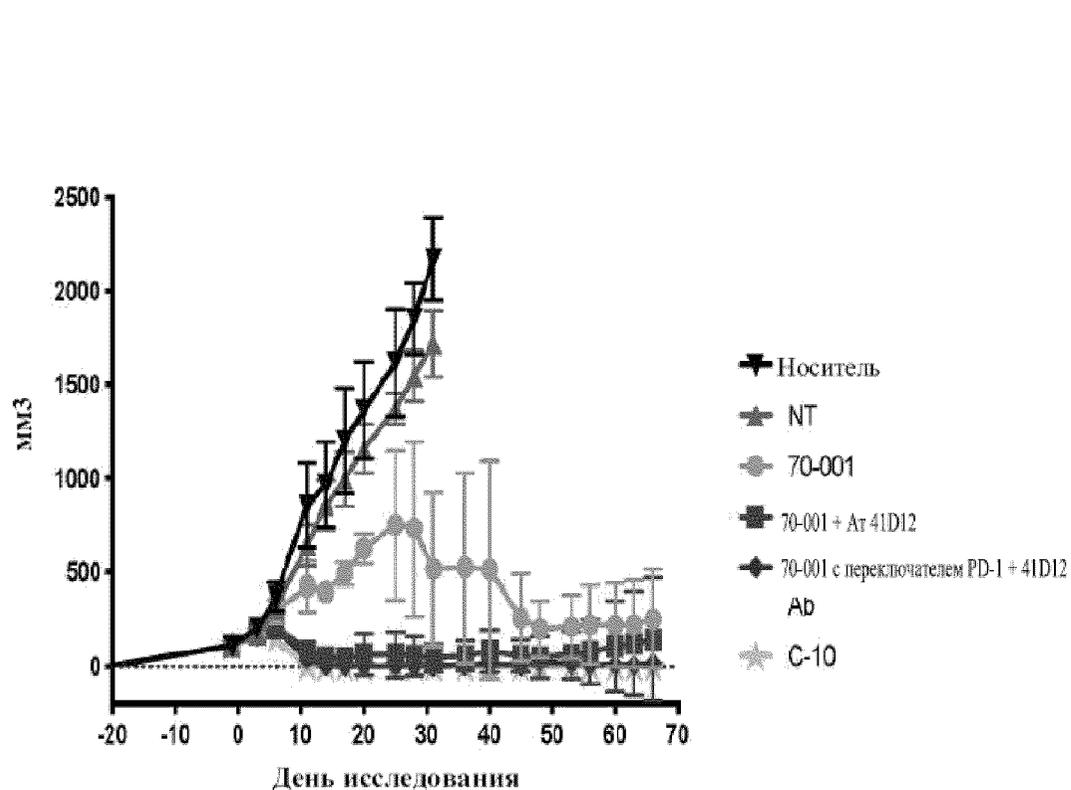
Соотношение E:T

R22 24ч K562



Соотношение E:T

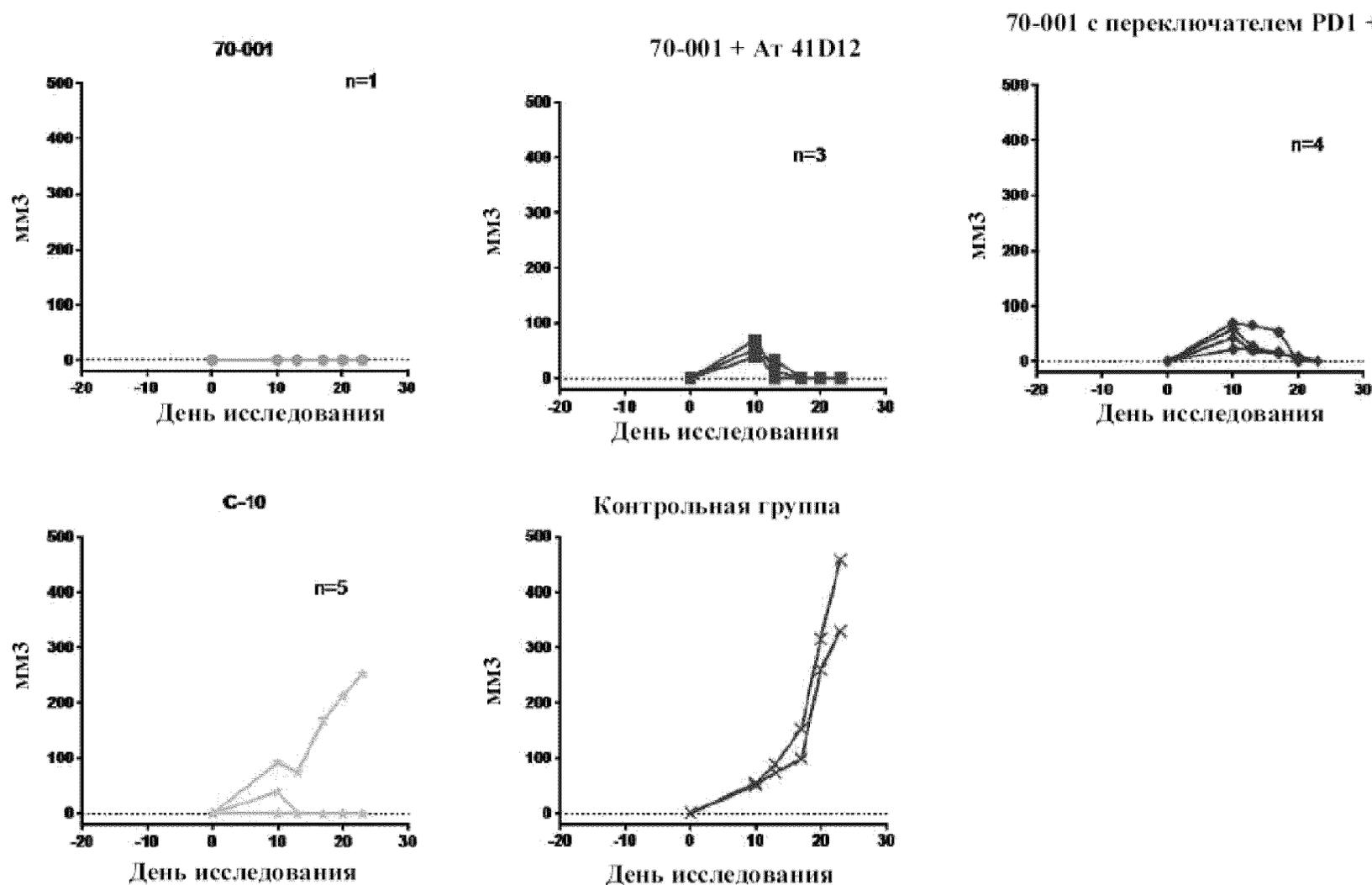
# TRuC CD70 приводят к регрессии опухоли 786-0



11/1/18

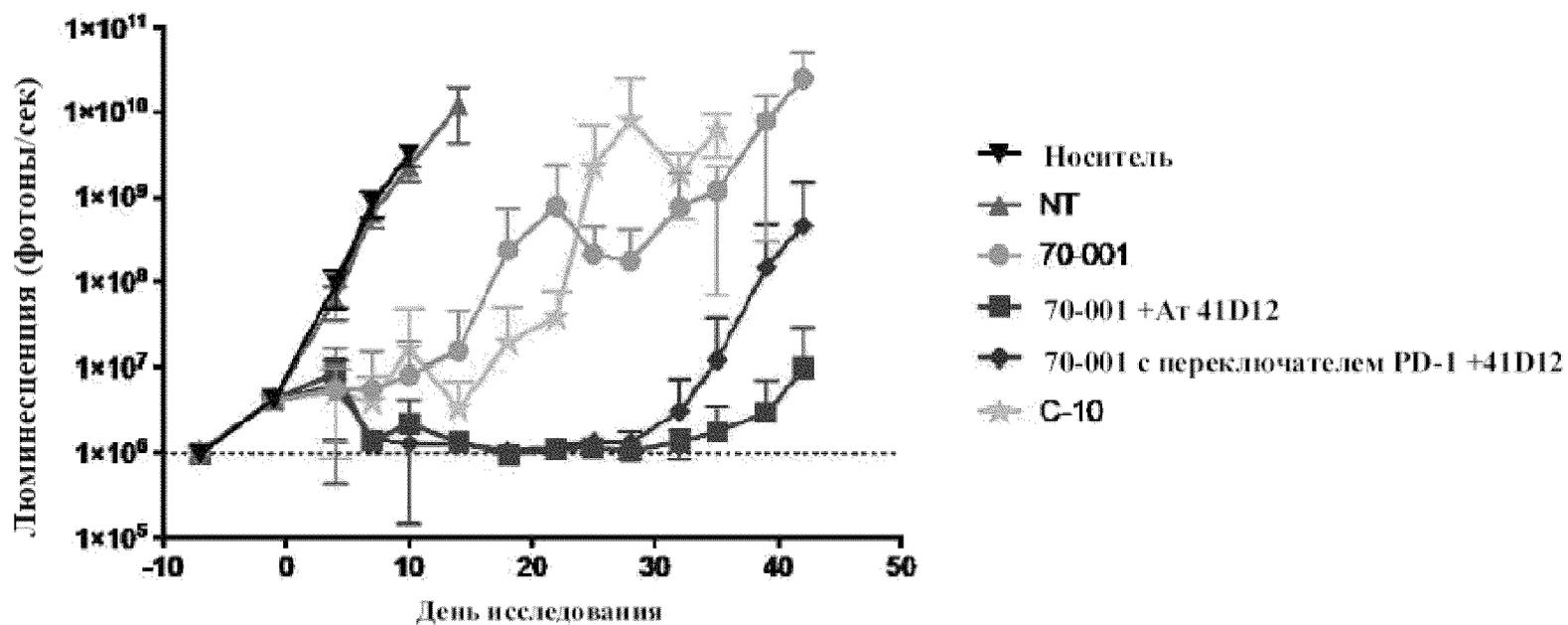
ФИГ. 72А

# Мыши без опухолей, повторно п/к зараженные 786-0



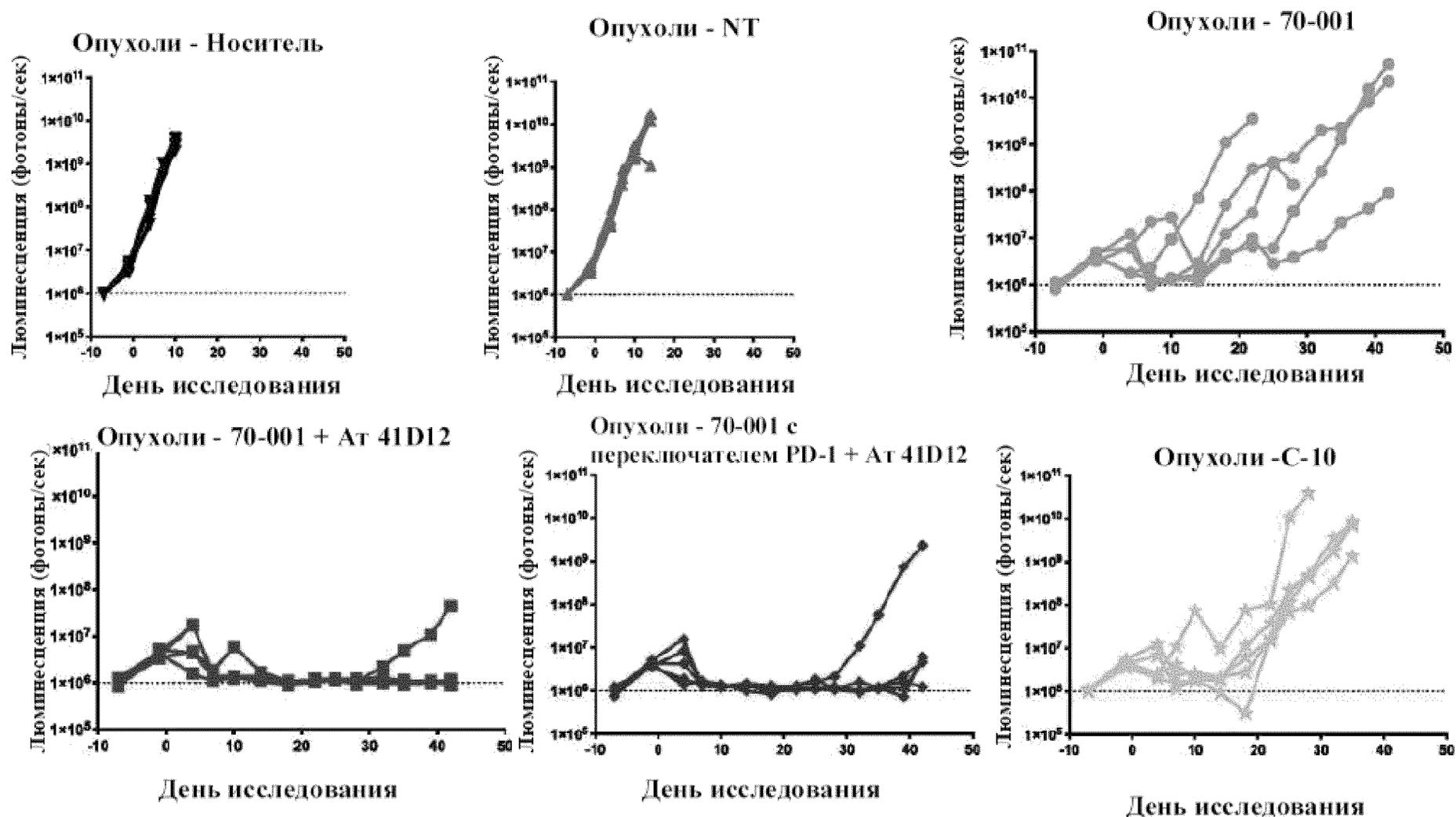
ФИГ. 72В

# Эффективность в отношении опухоли Raji

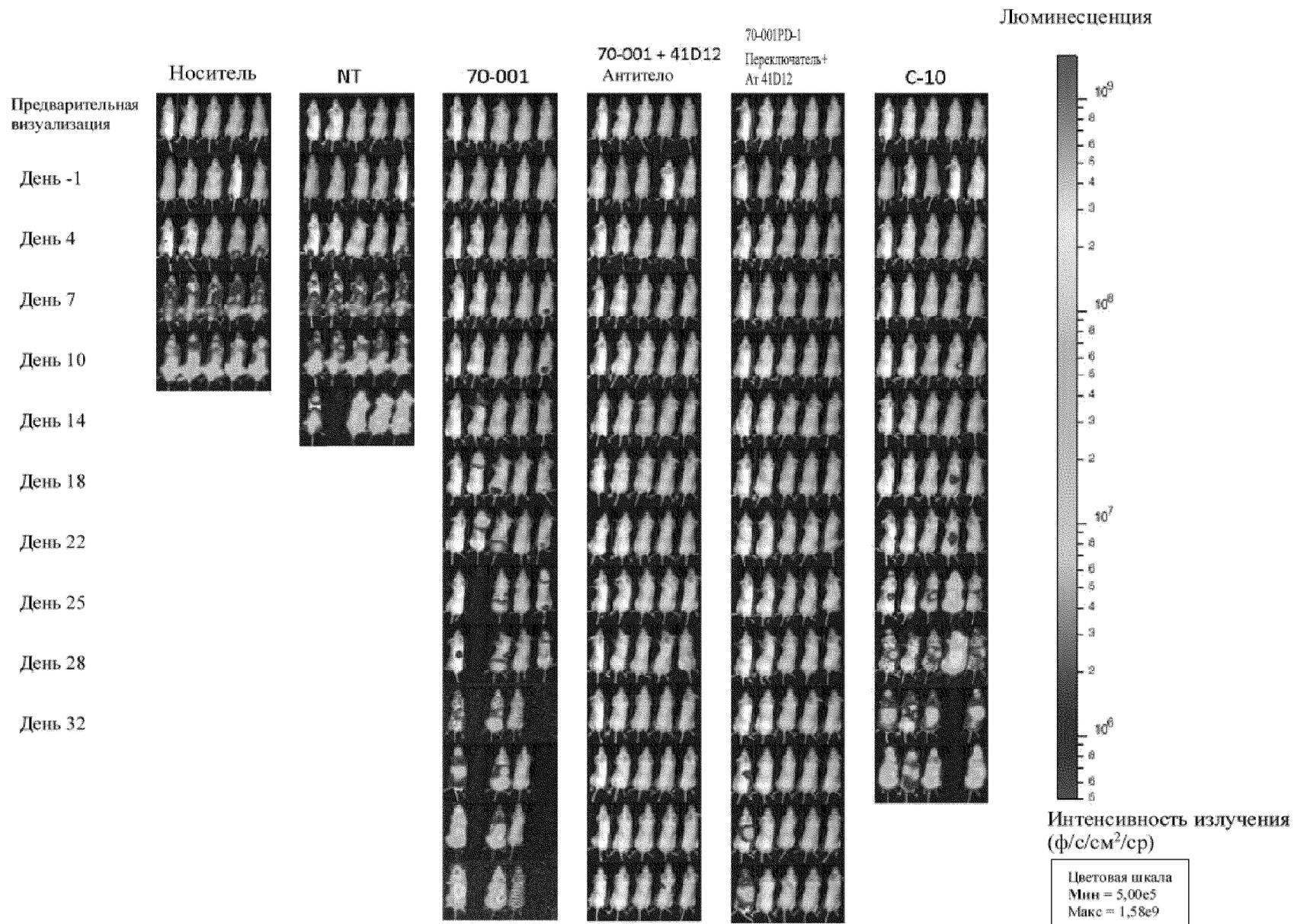


ФИГ. 73А

# Эффективность в отношении опухоли Raji

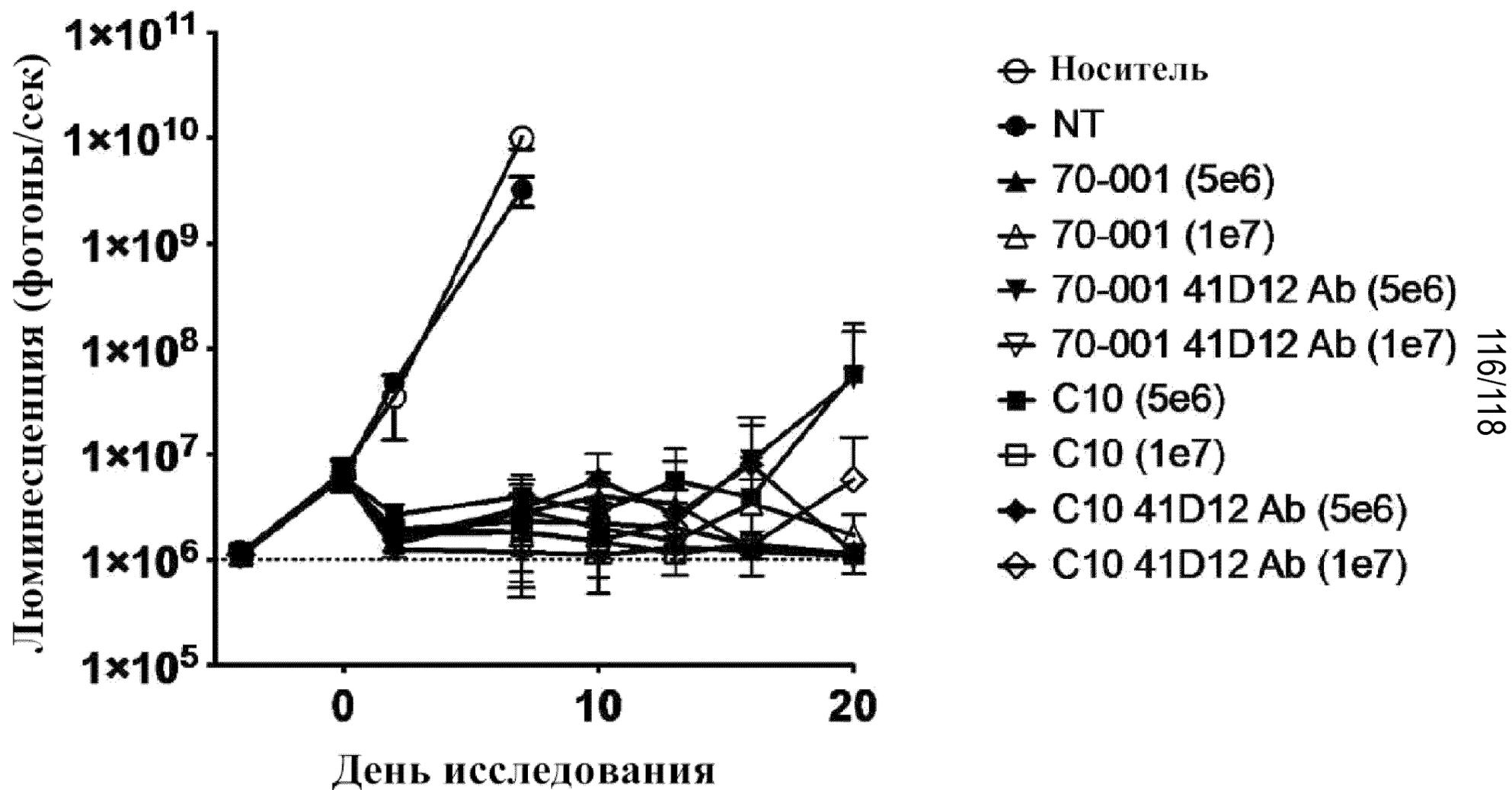


ФИГ. 73В



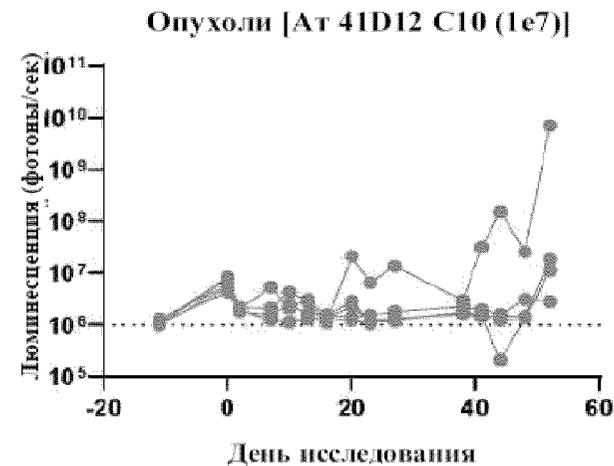
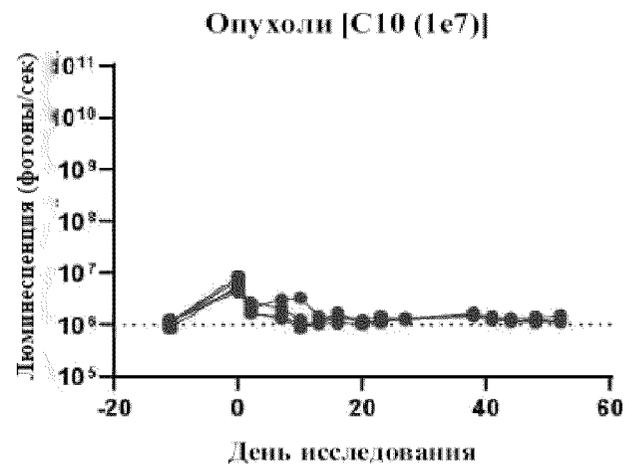
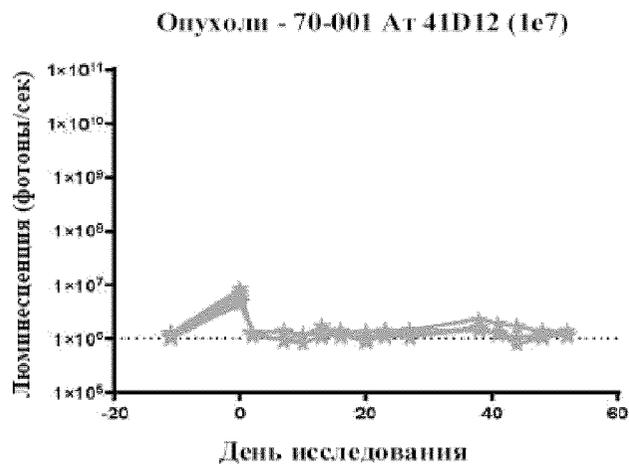
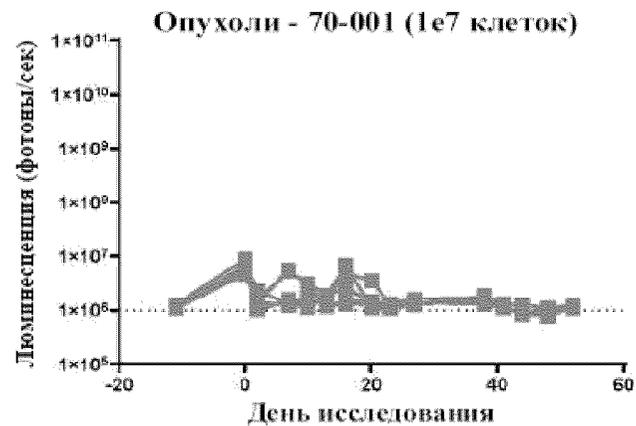
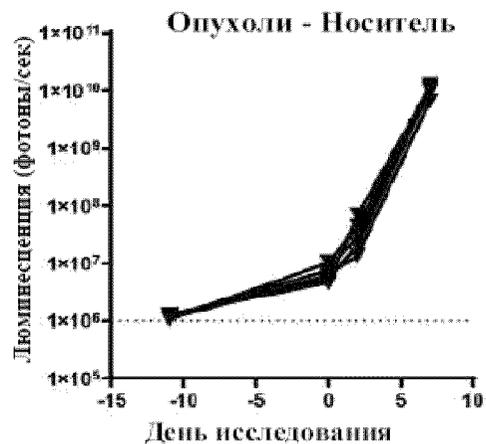
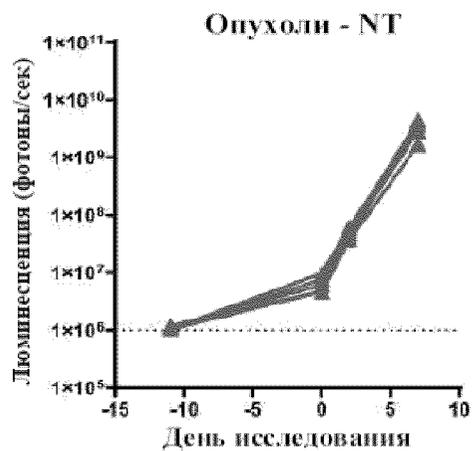
ФИГ. 73С

# Модель MOLM-13



ФИГ. 74А

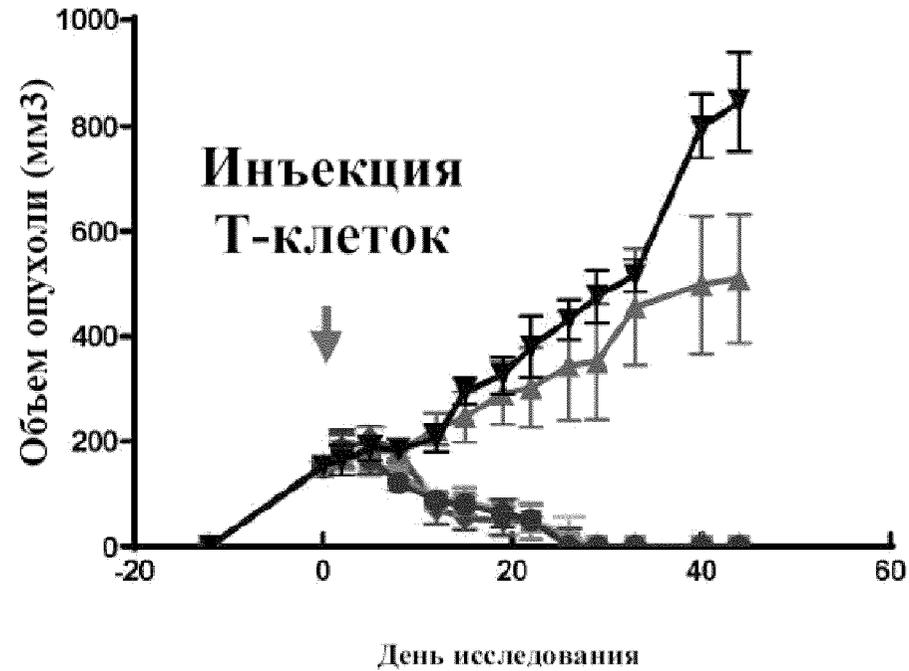
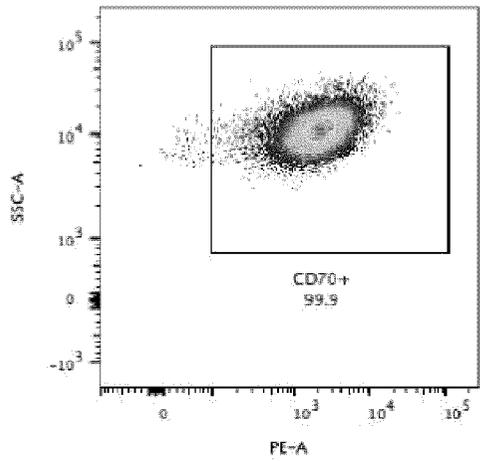
# 1e7 TFP-T-клеток



117/118

ФИГ. 74В

# ACHN (RCC)



- ▼ Носитель
- ▲ NT
- 70-001 (5e6)
- 70-001 41D12 Ab (5e6)
- ◆ C10 (5e6)
- ★ C10 41D12 Ab (5e6)

118/118

ФИГ. 75