

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392113** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

**(43)** Дата публикации заявки  
**2023.10.26**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2022.01.24**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 14/725** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

---

**(54)** **CD27-ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ ДОМЕН-СОДЕРЖАЩИЙ CAR ДЛЯ НАЦЕЛИВАНИЯ НА CD70-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ**

---

**(31)** 63/141,016; 63/270,414

**(32)** 2021.01.25; 2021.10.21

**(33)** US

**(86)** PCT/US2022/013458

**(87)** WO 2022/159791 2022.07.28

**(71)** Заявитель:  
**БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ**  
**ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС**  
**СИСТЕМ (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Резвани Кэйти, Шполл Элизабет,**  
**Базар Рафет, Ачария Сунил, Упрети**  
**Надима, Марин Коста Дэвид, Энсли**  
**Эмили (US)**

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

---

**(57)** Варианты осуществления изобретения включают способы и композиции, в которых используется анти-CD70 химерный антигенный рецептор (CAR), в котором отсутствует антитело или фрагмент антитела в качестве части рецептора, в том числе в качестве части антигенсвязывающей области CAR. В конкретных вариантах осуществления вместо CAR, в котором используется антитело для связывания CD70, в молекуле CAR используется CD27, рецептор для лиганда CD70. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит усеченный вариант CD27, а не полноразмерный CD27. В отдельных случаях в CAR отсутствует трансмембранный домен CD27.

---

**A1**

**202392113**

**202392113**

**A1**

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-578777EA/030

### **CD27-ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ ДОМЕН-СОДЕРЖАЩИЙ CAR ДЛЯ НАЦЕЛИВАНИЯ НА CD70-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ**

#### **Область техники**

[0001] Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки США № 63/141016, поданной 25 января 2021 г., и предварительной заявки США № 63/270414, поданной 21 октября 2021 г., которые обе в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки.

#### **Список последовательностей**

[0002] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен в формате ASCII и в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 18 января 2022 года, имеет название «MDAC.P1261WO\_ST25 SL.txt» и имеет размер 20919 байт.

#### **Область техники**

[0003] Варианты осуществления настоящего изобретения включают, по меньшей мере, области клеточной биологии, молекулярной биологии, иммунологии и медицины, в том числе лечения рака.

#### **Уровень техники**

[0004] Генетическое перепрограммирование естественных клеток-киллеров (NK) для адоптивной иммунотерапии рака имеет клинически значимые применения и преимущества, такие как: 1) врожденный противоопухолевый надзор без предварительной необходимости в сенсibilизации; 2) аллогенная эффективность без проявления реакции трансплантат против хозяина и 3) прямая клеточноопосредованная цитотоксичность и цитоллиз опухолей-мишеней. Развитие человеческих NK-клеток и приобретение ими самотолерантности, аллореактивности и эффекторных функций представляет собой адаптивный процесс установления, калибрования и «вооружения». На молекулярном уровне специфические активирующие и ингибирующие рецепторы контролируют клеточные функции NK посредством агрегации, балансирования и интеграции внеклеточных сигналов в различные эффекторные функции. Функциональная активность NK-клеток и реактивность на внешние стимулы следуют «реостатной» модели непрерывного обучения и, таким образом, поддаются перепрограммированию. Генетическая модификация NK-клеток для перенаправления их эффекторных функций является эффективным методом использования их цитотоксической способности к килингу опухолевых клеток.

[0005] CD70, лиганд цитокинового рецептора CD27, является привлекательным «панопухолевым антигеном», поскольку помимо экспрессии в гематологических злокачественных новообразованиях, таких как острый миелоидный лейкоз (AML) и лимфома, он также экспрессируется во многих солидных опухолях, включая рак почки, мочевого пузыря, легкого, тройной негативный рак молочной железы, почечно-клеточный

рак, рак поджелудочной железы и меланому, и он только транзистентно обнаруживается на активированных Т- и В-лимфоцитах и дендритных клетках. CD70 является особенно преимущественным в качестве мишени для иммунотерапии AML, поскольку, в отличие от других мишеней AML, он не экспрессируется на нормальных гемопоэтических стволовых клетках и, следовательно, в отличие от большинства методов CAR Т-терапии AML, имеющих в настоящее время в клинике, маловероятно, что он приведет к длительной цитопении и необходимости в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток реципиенту после CAR-терапии. Настоящее раскрытие обеспечивает решение давно назревших потребностей в области терапии рака для CD70-положительных видов рака.

### **Сущность изобретения**

[0006] Настоящее изобретение относится к способу и композициям для лечения или профилактики рака с использованием CD70-экспрессирующих клеток. Изобретение относится к конкретным анти-CD70 химерным антигенным рецепторам (CAR) и их применению для нацеливания на CD70-положительные злокачественные опухоли любого типа. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, нацеленный на CD70, в том числе при специфическом связывании с CD70, не является антителом. В конкретных вариантах осуществления в анти-CD70 CAR отсутствует антитело любого типа, включая scFv, которое связывается с CD70. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный домен анти-CD70 CAR не содержит scFv или антитела любого другого типа.

[0007] В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, нацеленный на CD70, представляет собой природный рецептор CD70, такой как рецептор CD27. В определенных случаях в молекуле CAR используется участок или весь CD27. В аспектах изобретения антигенсвязывающий домен, присутствующий в молекуле анти-CD70 CAR, включает участок или весь внеклеточный домен CD27, и в определенных случаях в молекуле CAR используется или не используется трансмембранный домен CD27. В некоторых случаях вместо трансмембранного домена CD27 используется трансмембранный домен CD28, несмотря на использование внеклеточного домена CD27 в CAR. Для CAR можно использовать определенные внутриклеточные домены, такие как один CD3дзета или комбинации CD3дзета либо с DAP10, либо с DAP12, и в некоторых случаях внутриклеточный домен не включает домен 4-1BB.

[0008] Варианты осуществления изобретения включают любой полинуклеотид, который кодирует часть или весь анти-CD70 CAR. Конкретные варианты осуществления включают полинуклеотиды, которые кодируют анти-CD70 CAR, содержащие антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и, по меньшей мере, один внутриклеточный домен (включая один или более костимулирующих доменов), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, который не содержит антитела. Настоящее изобретение также относится к векторам, которые содержат экспрессионные конструкции, кодирующие анти-CD70 CAR и, необязательно, другие гены. Векторы могут быть или не быть вирусными. Также настоящее изобретение относится к клеткам, несущим векторы, включая иммунные клетки любого типа, такие как, по меньшей мере, NK-клетки или Т-

клетки. В некоторых случаях клетки представляют собой готовые клетки, включая NK-клетки, и эти клетки могут или могут уже не подвергаться манипуляциям для экспрессии одного или более гетерологичных генов, таких как один или более экзогенных цитокинов.

[0009] В настоящем документе описываются способы лечения или профилактики рака любого вида, включающие введение клеток, экспрессирующих определенные анти-CD70 CAR, в терапевтически эффективном количестве для облегчения или профилактики рака, или снижения риска развития рака, уменьшения тяжести злокачественного заболевания, предупреждения метастазирования или его риска или замедления начала развития рака.

[0010] Варианты осуществления настоящего изобретения включают способы нацеливания на клетки, экспрессирующие CD70, и в конкретных вариантах осуществления клетки являются опухолевыми, тогда как в других способах клетки, экспрессирующие CD70, представляют собой иммунорегуляторные клетки, такие как Treg.

[0011] Настоящее изобретение относится к способам конструирования NK-клеток человека (в том числе из пуповинной крови (CB)) для нацеливания на CD70+ve опухоли с использованием CD27-эктодомена CAR. В данном документе описаны различные новые конструкции CAR, в которых внеклеточный связывающий участок CD27 (CD27eCAR или CD27 EC) слит с активирующими сигнальными эндодоменами, которые включают либо один CD3 $\xi$ , либо в комбинации с костимулирующими или адапторными сигнальными доменами, такими как 4-1BB, CD28, DAP10 или DAP12 и ген цитокина, такого как IL15, IL-12, IL-18 или IL-21, для поддержания выживаемости и пролиферации NK-клеток. В серии исследований *in vitro* подтверждена активность клеток CB-NK, трансдуцированных CD27eCAR/IL-15, против мишеней AML и лимфомы.

[0012] Варианты осуществления настоящего изобретения включают полинуклеотиды, кодирующие анти-CD70 химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий сигнальный пептид, анти-CD70 антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и, по меньшей мере, один внутриклеточный домен, где анти-CD70 антигенсвязывающий домен не содержит антитела и, необязательно, где трансмембранный домен CAR не является трансмембранным доменом CD27. В конкретных вариантах осуществления анти-CD70 антигенсвязывающий домен находится во внеклеточном домене CD27 и/или может быть кодон-оптимизированным. В конкретных аспектах антигенсвязывающий домен содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO:2. В некоторых случаях антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен содержат, состоят или по существу состоят из SEQ ID NO:1. Последовательность, которая кодирует трансмембранный домен, может быть кодон-оптимизированной, и/или трансмембранный домен может происходить из CD28, альфа-цепи T-клеточного рецептора, бета-цепи T-клеточного рецептора, дзета-цепи T-клеточного рецептора, CD3дзета, CD3эпсилон, CD3гамма, CD3 дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR /CD357, NKG2D, DAP10 или DAP12. В конкретном случае трансмембранный домен CD28 содержит, состоит или по



существу состоит из SEQ ID NO:3. CAR может содержать два или более, или три или более внутриклеточных домена. Внутриклеточный домен может содержать любой сигнальный домен, содержащий ITAM. Внутриклеточный домен может содержать CD3дзета. Внутриклеточный домен может представлять собой внутриклеточный костимулирующий домен, например, выбранный из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB, DAP12, NKG2D, OX-40 (CD134), DAP10, CD40L, 2B4, DNAM, CS1, CD48, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 и их комбинации.

[0013] В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид происходит из CD27 или рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GMSCF-R), и последовательность сигнального пептида CD27 может содержать, состоять или по существу состоять из SEQ ID NO: 6. Сигнальный пептид может происходить из CD27, анти-CD70 антигенсвязывающий домен может происходить из CD27, трансмембранный домен может происходить из CD27, и внутриклеточный домен может происходить из CD27. Сигнальный пептид может содержать, состоять или по существу состоять из SEQ ID NO: 6. CAR может содержать, состоять или по существу состоять из SEQ ID NO:4. В некоторых случаях трансмембранный домен содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:7. В некоторых аспектах внутриклеточный домен содержит одну или более из последовательностей SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12. CAR может содержать, состоять или по существу состоять из SEQ ID NO:5. CAR может содержать, состоять или по существу состоять из SEQ ID NO:1.

[0014] В конкретных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует CAR, и CAR содержит одно или более из следующего:

- (a) сигнальный пептид CD27 (SP), внеклеточный домен (EC) CD27, трансмембранный домен CD27 (TMD), внутриклеточный домен (ICD) DAP12 и CD3дзета;
- (b) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD, DAP12 ICD;
- (c) CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD, DAP12 ICD и CD3дзета;
- (d) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, DAP12 ICD и CD3дзета;
- (e) CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD, член 2 группы естественных киллеров D (NKG2D) ICD и CD3дзета;
- (f) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD, NKG2D ICD и CD3дзета;
- (g) CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD, член 2 группы естественных киллеров D (NKG2D) ICD и CD3дзета;
- (h) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, NKG2D ICD и CD3дзета;
- (i) CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD, 4-1BB ICD и CD3дзета;
- (j) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный

CD27 TMD, 4-1BB ICD и CD3дзета;

(k) CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD, 4-1BB ICD и CD3дзета;

(l) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, 4-1BB ICD и CD3дзета;

(m) CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD, DAP10 ICD и CD3дзета;

(n) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD, DAP10 ICD и CD3дзета;

(o) CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD, DAP10 ICD и CD3дзета;

(p) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, DAP10 ICD и CD3дзета;

(q) CD27 SP, полноразмерный CD27 (FL), CD27 TMD, CD27 ICD и CD3дзета;

(r) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 FL, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD и CD3дзета;

(s) CD27 SP, CD27 FL, CD27 TMD, CD27 ICD, CD28 ICD и CD3дзета;

(t) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 FL, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD, CD28 ICD и CD3дзета;

(u) CD27 SP, CD27 FL, CD27 TMD, CD27 ICD, 4-1BB ICD и CD3дзета;

(v) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 FL, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD, 4-1BB ICD и CD3дзета;

(w) CD27 SP, CD27 FL, CD27 TMD, CD27 ICD, DAP10 ICD и CD3дзета;

(x) GMSCF-R SP, CD27 FL, CD27 TMD, CD27 ICD, DAP10 ICD и CD3дзета;

(y) CD27 SP, CD27 FL, CD27 TMD, CD27 ICD, DAP12 ICD и CD3дзета;

(z) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 FL, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD, DAP12 ICD и CD3дзета;

(aa) CD27 SP, CD27 FL, CD27 TMD, CD27 ICD, NKG2D ICD и CD3дзета;

(bb) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 FL, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD, NKG2D ICD и CD3дзета;

(cc) CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD и CD3дзета;

(dd) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD и CD3дзета;

(ee) CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD и CD3дзета;

(ff) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD28 TMD и CD3дзета;

(gg) CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD, CD28 ICD и CD3дзета;

(hh) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD, CD28 ICD и CD3дзета;

(ii) CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD, CD28 ICD и CD3дзета; или

(jj) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD и CD3дзета.

[0015] Варианты осуществления настоящего изобретения включают клетки, которые содержат любые полинуклеотиды, описанные в настоящем документе. Клетки могут быть

или могут не быть иммунными клетками. Примеры иммунных клеток включают естественные клетки-киллеры (NK), Т-клетки, гамма-дельта-Т-клетки, инвариантные NKT-клетки (iNKT), В-клетки, макрофаги, MSC или дендритные клетки. Когда клетки представляют собой NK-клетки, то они могут быть получены из пуповинной крови, периферической крови, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, костного мозга, гемопоэтических стволовых клеток (HSC), из клеточной линии или их смеси. Линия NK-клеток может представлять собой клеточную линию NK-92 или другую NK-клеточную линию, полученную из опухоли или здоровой NK-клетки, или является клеткой-предшественником. В конкретных вариантах осуществления NK-клетка происходит из моноклеарной клетки пуповинной крови. NK-клетка может представлять собой CD56+ NK-клетку. В некоторых случаях NK-клетки экспрессируют один или более экзогенно введенных цитокинов, таких как IL-15, IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, IL-7 или их комбинацию.

[0016] Варианты осуществления настоящего изобретения включают популяции иммунных клеток по настоящему изобретению, где указанные клетки находятся в подходящей среде. В определенных случаях иммунные клетки представляют собой NK-клетки. Иммунные клетки могут быть получены или могут быть не получены из хранилищ криоконсервированных клеток.

[0017] В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам киллинга CD70-положительных клеток у субъекта, включающим стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества клеток, содержащих любой полинуклеотид, описанный в настоящем документе. Клетки могут представлять собой NK-клетки, Т-клетки, гамма-дельта-Т-клетки, инвариантные NKT-клетки (iNKT), В-клетки, макрофаги, гамма-дельта-Т-клетки или дендритные клетки. NK-клетки могут быть получены из пуповинной крови, периферической крови, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, костного мозга, HSC или из клеточной линии. NK-клетки могут быть получены из моноклеарных клеток пуповинной крови. В некоторых случаях CD70-положительные клетки не являются опухолевыми клетками и могут представлять собой Т-регуляторные клетки. Субъект может иметь или подозреваться в наличии любой CD70-экспрессирующей злокачественной опухоли. Субъект может иметь или подозреваться в наличии, например, острого миелоидного лейкоза, лимфомы, рака легкого, почечно-клеточного рака, рака мочевого пузыря, меланомы, глиобластомы, рака молочной железы, рака головы и шеи, мезотелиомы, множественной миеломы, рака поджелудочной железы или их комбинации. Клетки могут быть аллогенными или аутологичными по отношению к субъекту. Субъект может быть человеком. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят субъекту один или более раз. Продолжительность времени между введениями клеток субъекту может составлять 1-24 ч, 1-7 суток, 1-4 недели, 1-12 месяцев или один год или более.

[0018] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, способ дополнительно включает стадию предоставления субъекту эффективного количества дополнительного лечения, такого как хирургическое

вмешательство, лучевая терапия, генная терапия, иммунотерапия и/или гормональная терапия. В некоторых случаях дополнительная терапия включает одно или несколько антител.

[0019] В конкретных вариантах осуществления клетки вводят субъекту путем инъекции, внутривенно, внутриартериально, внутривнутрибрюшинно, внутритрахеально, интратуморально, внутримышечно, эндоскопически, в очаг поражения, интракраниально, чрескожно, подкожно, регионарно, путем перфузии, в микроокружение опухоли, или их комбинацией. В конкретных вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию идентификации CD70-положительных клеток у субъекта.

[0020] Вышеизложенное в общих чертах описывает признаки и технические преимущества настоящего раскрытия, чтобы можно было лучше понять следующее подробное описание. Далее будут описаны дополнительные признаки и преимущества, которые составляют предмет формулы изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что раскрытая сущность изобретения и конкретные варианты осуществления можно легко использовать в качестве основы для модификации или конструировании других структур для достижения тех же целей, что и настоящие конструкции. Специалистам в данной области также должно быть понятно, что такие эквивалентные конструкции не отступают от сущности и объема изобретения, изложенных в прилагаемой формуле изобретения. Новые признаки, которые считаются характерными для конструкций, описанных здесь, как в отношении организации, так и в отношении способа функционирования, вместе с дополнительными задачами и преимуществами, будут лучше понятны из следующего описания при рассмотрении с прилагаемыми фигурами. Однако следует четко понимать, что каждая из фигур представлена только с целью иллюстрации и описания и не предназначена для определения пределов настоящего раскрытия.

### **Краткое описание фигур**

[0021] Для более полного понимания настоящего раскрытия теперь делается ссылка на следующее описание, взятое вместе с прилагаемыми фигурами.

[0022] На фиг. 1A-1B показана экспрессия CD70 в образцах пациента с AML с использованием графиков Tsne.

[0023] На фиг. 2A-2E показаны различные конструкции анти-CD70 CAR.

[0024] В следующей таблице представлена информация об усеченных (tr) и полноразмерных (fl) конструкциях CD27 и их соответствующих ссылочных номерах, использованных в данных, включенных в настоящий документ. S. No относится к порядковому номеру.

| Порядковый номер | Название конструкции | ID         |
|------------------|----------------------|------------|
| 1                | CD27TrCD28icdCD3ZIL1 | trCD27 #1  |
| 2                | GSPco27Tr28CD3z15    | trCD27 #2  |
| 3                | CD27tr28tdmCD3zIL15  | trCD27 #3  |
| 4                | GSPco27Tr28tmd3z15   | trCD27 #4  |
| 5                | CD27TrCD3ZIL15       | trCD27 #5  |
| 6                | GSPco27Tr3z15        | trCD27 #6  |
| 7                | CD27TrNKG2Dic3z15    | trCD27 #7  |
| 8                | GSPco27TrNKG2Dicd3z1 | trCD27 #8  |
| 9                | CD27Tr28tmdNKG2Dic3z | trCD27 #9  |
| 10               | GSPco27Tr28tmdNKG2Di | trCD27 #10 |
| 11               | CD27Tr28tmdDAP12icd3 | trCD27 #11 |
| 12               | GSPco27Tr28tmddap12i | trCD27 #12 |
| 13               | CD27TrDAP12icd3z15   | trCD27 #12 |
| 14               | GSPco27Trdap12icd3z1 | trCD27 #14 |
| 15               | CD27Tr28tmdDAP10icd3 | trCD27 #15 |
| 16               | GSPco27Tr28tmdDAP10i | trCD27 #16 |
| 17               | CD27TrDAP10icd3z15   | trCD27 #17 |
| 18               | GSPco27FLdap10icd3z1 | trCD27 #18 |
| 19               | CD27Tr28tmd41BBicd3z | trCD27 #19 |
| 20               | GSPco27Tr28tmd41BBic | trCD27 #20 |
| 21               | CD27Tr41BBicd3z15    | trCD27 #21 |
| 22               | GSPco27Tr41BBicd3z15 | trCD27 #22 |
| 23               | CD27TrCD28tmdicd3z15 | trCD27 #24 |
| 24               | GSPco27Tr28tmdicCD3z | trCD27 #25 |

|    |                      |            |
|----|----------------------|------------|
| 25 | CD27FLDAP10icd3z15   | fICD27 #1  |
| 26 | SPco27FLdap10icd3z15 | fICD27 #2  |
| 27 | CD27FLDAP12icd3z15   | fICD27 #3  |
| 28 | SPco27FLdap12icd3z15 | fICD27 #4  |
| 29 | CD27FLNKG2Dic3z15    | fICD27 #5  |
| 30 | SPco27FLNKG2Dicd3z15 | fICD27 #6  |
| 31 | CD27FLCD3zIL15       | fICD27 #7  |
| 32 | GSPco27FLcd3z15      | fICD27 #8  |
| 33 | CD27FLCD28icd3z15    | fICD27 #9  |
| 34 | GSPco27FL28CD3z15    | fICD27 #10 |
| 35 | CD27FL41BBicd3z15    | fICD27 #11 |
| 36 | GSPco27FL41BBicd3z15 | fICD27 #12 |

[0025] В отношении данной таблицы, то информация об усеченных (tr) и полноразмерных (fl) конструкциях CD27 и их соответствующих идентификационных номерах, использованных на фигурах, следующая:

[0026] GSP: сигнальный пептид рецептора GMCSF

[0027] co: кодон-оптимизированный

[0028] CD28 tmd: трансмембранный домен CD28

[0029] CD27 tmd: трансмембранный домен CD27

[0030] 3z: сигнальный CD3дзета

[0031] CD28 ic: внутриклеточный домен CD28

[0032] Член группы 2 естественных киллеров D (NKG2D) ic: внутриклеточный домен NKG2D

[0033] Dap12 icd: внутриклеточный домен DAP12

[0034] Dap10 icd: внутриклеточный домен DAP12

[0035] 41bb icd: внутриклеточный домен 41bb

[0036] На фиг. 3 показана эффективность трансфекции усеченных (tr) и полноразмерных (fl) конструкций CD27 в клетках 293T.

[0037] На фиг. 4 показана эффективность трансдукции усеченных (tr) и полноразмерных (fl) конструкций CD27 в NK-клетках, полученных из пуповинной крови.

[0038] На фиг. 5A-5C показана экспрессия CD70 на опухолевых мишенях и активность киллинга естественных клеток-киллеров пуповинной крови (CB-NK), трансдуцированных различными конструкциями trCD27 против CD70-положительных клеток Raji (фиг. 5A) и клеток Karpas (фиг. 5B) с использованием 4-ч анализа с Annexin-V (фиг. 5C). На фиг. 5C показан более эффективный киллинг различных клеток CB-NK, трансдуцированных trCD70, как клеток Raji (черный столбец), так и клеток Karpas (серый столбец) по сравнению с NT (нетрансдуцированными), IL15 (конструкция только с геном цитокина IL15) или CD70-IL15 (конструкция с CD70 scFv вместе с IL15) CAR-

трансдуцированные клетки CBNK.

[0039] На фиг. 6 показана дегрануляция CD107a (маркер цитотоксической активности NK-клеток) клетками CB-NK, трансдуцированными различными конструкциями trCD27 против клеток Raji и Karpas. Клетки CBNK, трансдуцированные TrCD27 CAR, и опухолевые клетки (Raji и Karpas) сокультивировали в соотношении 1:1 в присутствии антитела CD107a в течение 6 ч. После инкубации экспрессию CD107a оценивали с использованием проточной цитометрии. В столбцах, сгруппированных по три: левый (зеленый) столбец представляет собой контроль с клетками CB-NK в отсутствие сокультивирования с опухолевыми клетками, средний (черный) столбец представляет собой трансдуцированные trCD70 клетки CB-NK, сокультивированные с клетками Raji и правый (серый) столбец представляет собой трансдуцированные trCD70 клетки CB-NK, сокультивированные с клетками Karpas. Большинство клеток CB-NK, трансдуцированных trCD27, показали повышенную цитотоксическую активность в отношении клеток Raji и Karpas по сравнению с клетками CB-NK, трансдуцированными NT, IL15 или CD70-IL15 CAR.

[0040] На фиг. 7A-7B показана активность киллинга клеток CB-NK, трансдуцированных различными конструкциями trCD27, для клеток Raji (фиг. 7A) и клеток Karpas (фиг. 7B) с использованием визуализации живых клеток Incucyte. Клетки CBNK, трансдуцированные TrCD27 CAR, и клетки Raji или Karpas сокультивировали в соотношении 1:1, и каждый час в течение 12-ч периода измеряли цитотоксичность NK-клеток в режиме реального времени против клеток Raji и Karpas. Клетки CB-NK, трансдуцированные TrCD27, показали повышенную цитотоксическую активность в отношении клеток Raji и Karpas по сравнению с клетками CB-NK, трансдуцированными NT, IL15 или CD70-IL15 CAR. Опухолевые клетки, культивированные в отсутствие клеток CBNK (только опухолевые клетки), использовали в качестве контроля.

[0041] На фиг. 8A-8B показана противоопухолевая активность *in vivo* клеток CB-NK, трансдуцированных различными конструкциями trCD27, в отношении клеток Raji, имеющих высокую экспрессию CD70. На фиг. 8A показана биoluminesцентная визуализация опухолей Raji после инфузии клеток CB-NK, трансдуцированных различными CAR trCD27. На фиг. 8B приведены кривые выживаемости после инфузии клеток CB-NK, трансдуцированных различными CAR trCD27.

[0042] На фиг. 9A-9B показана противоопухолевая активность *in vivo* клеток CB-NK, трансдуцированных различными конструкциями trCD27, для клеток THP-1, имеющих высокую экспрессию CD70. На фиг. 9A показана биoluminesцентная визуализация опухолей THP-1 после инфузии клеток CB-NK, трансдуцированных различными CAR trCD27. На фиг. 9B показаны кривые выживаемости после инфузии клеток CB-NK, трансдуцированных различными CAR trCD27.

#### **Подробное описание изобретения**

[0043] В соответствии с давним соглашением в области патентного права слова «а» и «ан», используемые в настоящем описании вместе со словом «содержащий», включая

формулу изобретения, означают «один или более». Некоторые варианты осуществления изобретения могут состоять или по существу состоять из одного или более элементов, стадий способа и/или способов по изобретению. Полагается, что любой способ или композиция, описанные в настоящем документе, могут быть реализованы в отношении любого другого способа или композиции, описанных в настоящем документе, и что различные варианты осуществления могут быть объединены.

[0044] В данном описании, если по контексту не требуется иного, то слова «содержать», «содержит» и «содержащий» следует понимать как подразумевающие включение указанной стадии или элемента, или группы стадий или элементов, но не исключение любой другой стадии или элемента или группы стадий или элементов. Под «состоящим из» подразумевается включение и ограничение всего, что следует за выражением «состоящий из». Таким образом, выражение «состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются обязательными или необходимыми, и что никакие другие элементы не могут присутствовать. Под выражением «состоящим по существу из» подразумевается включение любых элементов, перечисленных после выражения, и ограниченное другими элементами, которые не мешают деятельности или действию, указанному в раскрытии для перечисленных элементов, и не способствуют ему. Таким образом, выражение «состоящий по существу из» указывает на то, что перечисленные элементы являются обязательными или необходимыми, но никакие другие элементы не являются необязательными и могут присутствовать или не присутствовать в зависимости от того, влияют ли они на активность или действие перечисленных элементов.

[0045] Ссылка в данном описании на «один вариант осуществления», «вариант осуществления», «конкретный вариант осуществления», «связанный вариант осуществления», «определенный вариант осуществления», «дополнительный вариант осуществления» или «еще один вариант осуществления» или их комбинации означают, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с вариантом осуществления, включены, по меньшей мере, в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, появление приведенных выше выражений в различных местах данного описания не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом в одном или более вариантах осуществления.

[0046] В рамках настоящего изобретения, термины «или» и «и/или» используются для описания многих компонентов в комбинации или исключая один от другого. Например, «х, у и/или z» может относиться только к «х», только к «у», только к «z», «х, у и z», «(х и у) или z», «х или (у и z)» или «х или у или z». В частности, полагается, что х, у или z могут быть специально исключены из варианта осуществления.

[0047] В рамках данного изобретения, термин «примерно» используется в соответствии с его простым и обычным значением в области клеточной и молекулярной биологии для обозначения того, что значение включает стандартное отклонение ошибки для устройства или способа, используемого для определения значения.



[0048] Термин «сконструированный», используемый в данном документе, относится к объекту, созданному руками человека, включая клетку, нуклеиновую кислоту, полипептид, вектор и так далее. По меньшей мере, в некоторых случаях сконструированный объект является синтетическим и содержит элементы, которые не отсутствуют в природе или не конфигурированы таким образом, как он используется в раскрытии. В конкретных вариантах осуществления вектор сконструирован с использованием технологий рекомбинантной нуклеиновой кислоты, и клетка сконструирована путем трансфекции или трансдукции сконструированного вектора.

[0049] В рамках настоящего изобретения, термин «профилактировать» и подобные слова, такие как «профилактированный», «профилактика» и т. д., указывают на подход для профилактики, ингибирования или снижения вероятности возникновения или рецидива заболевания или патологического состояния, например, рака. Это также относится к задержке возникновения или рецидива заболевания или патологического состояния или к задержке возникновения или рецидива симптомов заболевания или патологического состояния. Используемый здесь термин «профилактика» и подобные слова также включают снижение интенсивности, влияния, симптомов и/или нагрузки заболевания или патологического состояния до начала или рецидива заболевания или патологического состояния.

[0050] В рамках настоящего изобретения, термин «образец» обычно относится к биологическому образцу. Образец может быть взят из ткани или клеток субъекта. В некоторых примерах образец может содержать или быть получен из биопсийного материала ткани, крови (например, цельной крови), плазмы крови, внеклеточной жидкости, высушенных пятен крови, культивированных клеток, отброшенной ткани. Образец мог быть выделен из источника до сбора. Неограничивающие примеры включают кровь (включая, помимо прочего, пуповинную кровь), сыворотку, плазму, спинномозговую жидкость, плевральную жидкость, амниотическую жидкость, лимфу, слюну, мочу, кал, слезы, пот, костный мозг или выделения из слизистых оболочек, и другие биологические жидкости, выделенные из основного источника до сбора. В некоторых примерах образец выделен из его основного источника (клетки, ткани, биологических жидкостей, таких как кровь, образцы окружающей среды и т. д.) во время подготовки образца. Образец может быть или может не быть очищенным или иным образом обогащенным из его первичного источника. В некоторых случаях первичный источник гомогенизируют перед дальнейшей обработкой. Образец можно отфильтровать или центрифугировать для удаления лейкоцитарной пленки, липидов или твердых частиц. Образец также может быть очищен или обогащен нуклеиновыми кислотами или может быть обработан РНКазами. Образец может содержать неповрежденные, фрагментированные или частично разрушенные ткани или клетки.

[0051] Термин «субъект», как он используется в настоящем документе, обычно относится к субъекту, имеющему биологический образец, который подвергается обработке или анализу, и, в определенных случаях, у которого имеется рак или имеется подозрение на

него. Субъектом может быть любой организм или животное, являющихся объектом способа или материала, включая млекопитающих, например, человека, лабораторных животных (например, приматов, крыс, мышей, кроликов), сельскохозяйственных животных (например, коров, овец, коз, свиней, индеек и кур), домашних животных (например, собак, кошек и грызунов), лошадей и трансгенных животных, отличных от человека. Субъектом может быть пациент, например, имеющий или с подозрением на наличие заболевания (которое может патологическим состоянием), такого как доброкачественные или злокачественные новообразования или рак. Субъект может проходить или уже прошел лечение. У субъекта могут отсутствовать симптомы заболевания. Субъектом могут быть здоровые субъекты, но желающие профилактировать рак. Термин «индивидуум» может использоваться взаимозаменяемо, по меньшей мере, в некоторых случаях. В рамках настоящего изобретения, «субъект» или «индивидуум» может находиться или может не находиться в медицинском учреждении и может лечиться как амбулаторный пациент в медицинском учреждении. Субъект может получать одну или более лечебных композиций через Интернет. Субъект может включать человека любого возраста или животное, отличное от человека, и, следовательно, включает как взрослых, так и несовершеннолетних (т.е. детей) и младенцев, а также включает субъектов, находящихся в утробе матери. Не полагается, что данный термин означает обязательную потребность в лечении, следовательно, человек может добровольно или невольно участвовать в экспериментах, будь то клинические испытания или фундаментальные научные исследования.

[0052] В рамках настоящего изобретения, термин «лечение» или «проводить лечение» включает любой благоприятный или желательный эффект на симптомы или патологию заболевания или патологического состояния и может включать даже минимальное снижение одного или более измеримых маркеров заболевания или патологического состояния, которые лечатся, например, рака. Лечение может необязательно включать либо снижение или ослабление симптомов заболевания или патологического состояния, либо замедление прогрессирования заболевания или патологического состояния. «Лечение» не обязательно означает полную ликвидацию или излечение заболевания или патологического состояния или связанных с ним симптомов.

[0053] Настоящее изобретение относится к нацеливанию на злокачественные опухоли, экспрессирующие CD70, с использованием анти-CD70 CAR, и в некоторых случаях CAR экспрессируется на NK-клетках, полученных из пуповинной крови. В данном документе описан ряд новых молекул CAR, которые были получены путем слияния внеклеточного связывающего участка CD27 (CD27eCAR) с активирующим сигнальным эндодоменом, который включает один CD3 $\xi$  или в комбинации с костимулирующими или адапторными сигнальными доменами, такими как 4-1BB, CD28, DAP10 или DAP12 и, по меньшей мере, в некоторых случаях, ген цитокина, такого как IL15, IL-12, IL-18 или IL-21. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой слитую конструкцию внеклеточного домена CD27 (природный лиганд для CD70) со специфичностью в отношении антигена CD70 человека. Кроме того, в некоторых случаях для повышения

поверхностной экспрессии CD27 на поверхности трансдуцированных клеток использовали оптимизацию кодонов. В некоторых случаях вектор, содержащий экспрессионную конструкцию, кодирующую анти-CD70 CAR, также несет ген цитокина, например, продуцирующий человеческий интерлейкин 15 (IL-15), IL-12, IL-18 или IL-21, для поддержания выживаемости и сохранения клеток, несущих вектор, включая, например, NK-клетки.

### **I. Химерные антигенные рецепторы (CAR)**

[0054] Иммунные клетки по настоящему изобретению могут быть генетически сконструированы для экспрессии одного или более антигенсвязывающих рецепторов, нацеленных на один или более антигенов, например, CD70, таких как сконструированные CAR. Например, иммунные клетки могут представлять собой иммунные клетки, модифицированные для экспрессии CAR, обладающего антигенной специфичностью в отношении CD70. Другие CAR могут экспрессироваться теми же клетками, что и клетки, экспрессирующие антигенный рецептор CD70, и они могут быть нацелены на другие антигены. В некоторых аспектах иммунные клетки сконструированы для экспрессии CD70-специфического CAR путем нокаута CAR с использованием, например, технологии CRISPR/Cas.

[0055] Подходящие способы модификации клеток известны в данной области. См., например, Sambrook and Ausubel, выше. Например, клетки можно трансдуцировать для экспрессии CAR, обладающего антигенной специфичностью в отношении опухолевого антигена, с использованием методов трансдукции, описанных у Heemskerk et al., 2008 и Johnson et al., 2009.

[0056] В некоторых вариантах осуществления клетки содержат одну или более нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, которые кодируют один или более рецепторов, нацеленных на антиген (по меньшей мере, один из которых может быть нацелен на CD70), и генетически модифицированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е. обычно отсутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма или клетки, который, например, обычно не обнаруживается в сконструированной клетке и/или организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты не встречаются в природе, например, нуклеиновая кислота, не встречающаяся в природе (например, химерная).

[0057] Настоящее изобретение относится к CD70-специфическим CAR, которые содержат: а) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающую область, которая нацелена, в том числе специфически связывается с CD70; b) трансмембранный домен; и c) один или более внутриклеточных доменов, включая внутриклеточные сигнальные домены. В некоторых аспектах компонент антигенспецифического связывания или распознавания связан с трансмембранным доменом и одним или более внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления CAR включает трансмембранный домен,

слитый с внеклеточным доменом CAR, который содержит антигенсвязывающую область или домен. В одном варианте используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR, хотя в других случаях он не используется. В некоторых случаях трансмембранный домен выбран или модифицирован путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или других белков поверхностной мембраны, чтобы свести к минимуму взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

[0058] Настоящее изобретение относится к анти-CD70 CAR, которые содержат антигенсвязывающий домен, в котором не используется антитело или фрагмент антитела. В конкретных вариантах осуществления вместо анти-CD70 CAR, в которых используется антитело или фрагмент антитела в качестве антигенсвязывающего домена, в CAR вместо этого используется участок или весь CD27 в CAR, включая использование внеклеточного домена CD27 в качестве антигенсвязывающего домена CAR, в некоторых случаях.

[0059] Для справки, молекула CD27 (CD27) *Homo sapiens* на хромосоме 12 представлена в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI) GenBank® под идентификационным номером NG\_031995.1, который в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки. Нуклеотидная последовательность, кодирующая весь белок CD27, включает следующее:

[0060] ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCCTGGTG  
GGGCTCTCAGCTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCA  
GGGAAAGCTGTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCCTCGTGAAGGACTGTG  
ACCAGCATAGAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTGCATACCGGGGGTCTCCTTCTCTC  
CTGACCACCACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTGCGGCACTGTAACCTCTGGTCTTC  
TCGTTTCGCAACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTCGCAATGGCTGGC  
AGTGCAGGGACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCCAAACCCTTCGCTGACC  
GCTCGGTCGTCTCAGGCCCTGAGCCCACACCCTCAGCCCACCCACTTACCTTATGTC  
AGTGAGATGCTGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAG  
GCAGCTGCCTGCCCCGACTCTCTCTACCCACTGGCCACCCCAAAGATCCCTGTGCAG  
CTCCGATTTTATTTCGCATCCTTGTGATCTTCTCTGGAATGTTTCCTTGTTCCTTACCCCTGG  
CCGGGGCCCTGTTCTCCTCCATCAACGAAGGAAATATAGATCAAACAAAGGAGAAAGT  
CCTGTGGAGCCTGCAGAGCCTTGTGCTTACAGCTGCCCCAGGGAGGAGGAGGGCAG  
CACCATCCCCATCCAGGAGGATTACCGAAAACCGGAGCCTGCCTGCTCCCCCTGA  
(SEQ ID NO:9)

[0061] В любом полинуклеотиде по настоящему изобретению может использоваться SEQ ID NO:9 или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более % идентична SEQ ID NO:9.

[0062] Один пример полноразмерной последовательности белка CD27 дикого типа находится в NCBI GenBank® под идентификационным номером P26842 (он также идентичен аминокислотной последовательности с идентификационным номером NG\_031995.1):

1 MARPHPWWLC VLGTLVGLSA TPAPKSCPER HYWAQGKLCC QMCEPGTFLV  
 KDCDQHRKAA  
 61 QCDPCIPGVS FSPDHHTRPH CESCRCNSG LLVRNCTITA NAECACRNGW  
 QCRDKECTEC  
 121 DPLPNPSLTA RSSQALSPHP QPTHLPYVSE MLEARTAGHM QTLADFRQLP  
 ARTLSTHWPP  
 181 QRSLCSDFI RILVIFSGMF LVFTLAGALF LHQRRKYRSN KGESPVEPAE  
 PCHYSCPREE  
 241 EGSTIPIQED YRKPEPACSP

[0063] (SEQ ID NO:4)

[0064] В конкретных вариантах осуществления часть или вся SEQ ID NO:4 используется в CAR. Несмотря на то, что в некоторых вариантах осуществления полноразмерный белок CD27 дикого типа (или кодон-оптимизированный) используется в CAR, в других вариантах осуществления используется усеченный вариант белка CD27 дикого типа в качестве антигенсвязывающего домена в CAR. В конкретных примерах используется участок или весь внеклеточный домен CD27, так что усеченный CD27, используемый в качестве антигенсвязывающего домена, представляет собой усеченный вариант CD27, который усечен на С-конце природного белка.

[0065] Нуклеотидная последовательность, кодирующая усеченный вариант белка CD27 дикого типа, включает следующее:

[0066] GCTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCAG  
 GGAAAGCTGTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCCTCGTGAAGGACTGTGA  
 CCAGCATAGAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTGCATACCGGGGGTCTCCTTCTCTCC  
 TGACCACCACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTGCGGCACTGTAACCTCTGGTCTTCT  
 CGTTCGCAACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTGCAATGGCTGGCA  
 GTGCAGGGACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCCAAACCCTTCGCTGACCGC  
 TCGGTCGTCTCAGGCCCTGAGCCCACACCCTCAGCCCACCCACTTACCTTATGTGAG  
 TGAGATGCTGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAGGC  
 AGCTGCCTGCCCGGACTCTCTTACCCACTGGCCACCCCAAAGATCCCTGTGCAGCT  
 CCGATTTTATTCGC (SEQ ID NO:63)

[0067] В любом полинуклеотиде по настоящему изобретению может использоваться SEQ ID NO:63 или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более % идентична SEQ ID NO:63.

[0068] Полипептидная последовательность, кодирующая усеченный вариант белка CD27 дикого типа, включает следующее:

[0069] ATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPG  
 VSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPS  
 LTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQSRSLCS  
 SDFIR (SEQ ID NO:5)

[0070] В любом полинуклеотиде по настоящему изобретению может использоваться

SEQ ID NO:5 или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более % идентична SEQ ID NO: 5.

[0071] В конкретных случаях, когда в молекуле CAR используется полноразмерный белок CD27, дополнительный трансмембранный домен не используется. В конкретных случаях, когда полноразмерный белок CD27 используется в молекуле CAR, которая содержит свой собственный внутриклеточный сигнальный домен, в CAR может использоваться или может не использоваться дополнительный внутриклеточный сигнальный домен. В конкретных случаях, когда в молекуле CAR используется полноразмерный белок CD27, хотя он содержит собственный сигнальный пептид, может использоваться или может не использоваться дополнительный сигнальный пептид. В конкретных вариантах осуществления CD3дзета (и/или DAP10, DAP12, 2B4, CD28, NKG2D, 41BB или любой ITAM-содержащий сигнальный домен) используется в CAR.

[0072] В одном примере область CD27, которую используют в качестве антигенсвязывающего домена в молекуле CAR, содержит, состоит или по существу состоит из аминокислот 1-211 (включая CD27 TMD) SEQ ID NO:4. В другом примере область CD27, которая используется в молекуле CAR в качестве антигенсвязывающего домена, содержит, состоит или по существу состоит из аминокислот 1-191 (отсутствует CD27 TMD) SEQ ID NO:4. В конкретных примерах область CD27, используемая в молекуле CAR, содержит, состоит или по существу состоит из аминокислот 1-50, 1-51, 1-52, 1-53, 1-54, 1-55, 1-56, 1-57, 1-58, 1-59, 1-60, 1-61, 1-62, 1-63, 1-64, 1-65, 1-66, 1-67, 1-68, 1-69, 1-70, 1-71, 1-72, 1-73, 1-74, 1-75, 1-76, 1-77, 1-78, 1-79, 1-80, 1-81, 1-82, 1-83, 1-84, 1-85, 1-86, 1-87, 1-88, 1-89, 1-90, 1-91, 1-92, 1-93, 1-94, 1-95, 1-96, 1-97, 1-98, 1-99, 1-100, 1-101, 1-102, 1-103, 1-104, 1-105, 1-106, 1-107, 1-108, 1-109, 1-110, 1-111, 1-112, 1-113, 1-114, 1-115, 1-116, 1-117, 1-118, 1-119, 1-120, 1-121, 1-122, 1-123, 1-124, 1-125, 1-126, 1-127, 1-128, 1-129, 1-130, 1-131, 1-132, 1-133, 1-134, 1-135, 1-136, 1-137, 1-138, 1-139, 1-140, 1-141, 1-142, 1-143, 1-144, 1-145, 1-146, 1-147, 1-148, 1-149, 1-150, 1-151, 1-152, 1-153, 1-154, 1-155, 1-156, 1-157, 1-158, 1-159, 1-160, 1-161, 1-162, 1-163, 1-164, 1-165, 1-166, 1-167, 1-168, 1-169, 1-170, 1-171, 1-172, 1-173, 1-174, 1-175, 1-176, 1-177, 1-178, 1-179, 1-180, 1-181, 1-182, 1-183, 1-184, 1-185, 1-186, 1-187, 1-188, 1-189, 1-190, 1-191, 1-192, 1-193, 1-194, 1-195, 1-196, 1-197, 1-198, 1-199, 1-200, 1-201, 1-202, 1-203, 1-204, 1-205, 1-206, 1-207, 1-208, 1-209, 1-210, 1-211, 1-212, 1-213, 1-214, 1-215, 1-216, 1-217, 1-218, 1-219, 1-220, 1-221, 1-222, 1-223, 1-224, 1-225, 1-226, 1-227, 1-228, 1-229, 1-230, 1-231, 1-232, 1-233, 1-234, 1-235, 1-236, 1-237, 1-238, 1-239, 1-240, 1-241, 1-242, 1-243, 1-244, 1-245, 1-246, 1-247, 1-248, 1-249, 1-250, 1-251, 1-252, 1-253, 1-254, 1-255, 1-256, 1-57, 1-258, 1-259 или всех аминокислот (1-260) из SEQ ID NO:4; в конкретных вариантах осуществления такие аминокислоты в этих диапазонах являются смежными. В некоторых вариантах осуществления используется область SEQ ID NO:4, имеющая усечение на N-конце, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислот с N-конца. В некоторых случаях на этом N-конце имеет место усечение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислот, и имеется усечение на C-конце, такое как концы усечения, указанные в приведенном выше перечне.

[0073] В некоторых вариантах осуществления любая область молекулы CAR оптимизирована по кодонам. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит любой из примеров последовательностей CD27, описанных в настоящем документе, но оптимизированных по кодонам. В отдельных случаях антигенсвязывающий домен содержит усеченный на С-конце CD27 (например, внеклеточный домен), и он также является кодон-оптимизированным. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит, состоит или по существу состоит из аминокислот 1-191 CD27, и он также является кодон-оптимизированным. В других аспектах антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен содержат, состоят или по существу состоят из аминокислот 1-211 CD27, и он также является кодон-оптимизированным.

[0074] В некоторых случаях используется определенный компонент молекулы CAR. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит конкретный трансмембранный домен. Примеры включают трансмембранные домены из CD28 или из CD27. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD27 или трансмембранный домен CD28 не используются в CAR, тогда как в альтернативных вариантах осуществления в CAR используется трансмембранный домен CD27. В конкретных вариантах осуществления для CAR используются сигнальные пептиды, и примеры включают сигнальные пептиды CD27 или GMCSF-R, или могут использоваться оба. Примеры внутриклеточных сигнальных доменов для CAR включают, по меньшей мере, CD27, CD28, DAP10, DAP12, NKG2D, 4-1BB или их комбинацию.

[0075] В некоторых случаях в CAR используется сигнальный пептид CD27 (MARPHPWWLCVLGTLVGLS (SEQ ID NO:6); ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCCTGGTGGGGCTCTCA (SEQ ID NO:61)), или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более % идентична SEQ ID NO:6 или 61. В некоторых случаях в CAR используется сигнальный пептид GMCSF-R (MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (SEQ ID NO:14); ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCC TGATCCCA (SEQ ID NO:62)), или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более % идентична SEQ ID NO:14 или 62.

[0076] CAR может содержать или может не содержать CD27 TM (ILVIFSGMFLVFTLAGALFLH (SEQ ID NO:7); ATCCTTGTGATCTTCTCTGGAATGTTCTTGTTCACCTGGCCGGGGCCCTGTTCC TCCAT (SEQ ID NO:66)), или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более % идентична SEQ ID NO:7 или 66.

[0077] CAR может содержать или может не содержать ICD CD27, который представляет собой QRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO:8), или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более % идентична SEQ ID NO:8.

[0078] В некоторых вариантах осуществления CD3дзета ICD представляет собой

RVKFSRSAD      APAYQQGQNNQ      LYNELNLGRR      EEDVLDKRR  
 GRDPEMGGKPRRKNPQEG      YNELQKDKMA      EAYSEIGMKG      ERRRGKGHDG  
 LYQGLSTATKDTYDALHMQA      LPPRG      (SEQ ID NO:10),  
 CGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCA  
 GCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAA  
 GACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGA  
 AGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG  
 GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTC  
 AGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC  
 GGAC (SEQ ID NO:67), и может быть использоваться последовательность в CAR или  
 последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или  
 более % идентична SEQ ID NO:10 или 67.

[0079] В некоторых вариантах осуществления в молекуле CAR используется CD28  
 ICD (RSKRSRLHSD YMNMTPRRPGPTRKHYPYA PPRDFAAYRS; SEQ ID NO:11), или  
 последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или  
 более % идентична SEQ ID NO:11.

[0080] В некоторых вариантах осуществления в молекуле CAR используется 4-1BB  
 ICD (KRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:12);  
 AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGT  
 ACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAG  
 GAGGATGTGAACTG (SEQ ID NO:68)), или последовательность, которая, по меньшей  
 мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более % идентична SEQ ID NO:12 или 68.

[0081] В некоторых вариантах осуществления в молекуле CAR используется DAP10  
 ICD (LCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG (SEQ ID NO:72);  
 CTTTGCGCACGCCCACGCCGAGCCCCGCCCAAGAAGATGGCAAAGTCTACATCAA  
 CATGCCAGGCAGGGGC (SEQ ID NO:69)), или последовательность, которая, по меньшей  
 мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более % идентична SEQ ID NO: 69 или 72.

[0082] В некоторых вариантах осуществления в молекуле CAR используется DAP12  
 ICD (YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ  
 ID NO:74);  
 TACTTCCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCG  
 GAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGT  
 CGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAA (SEQ ID NO:71)),  
 или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99  
 или более % идентична SEQ ID NO:71 или 74.

[0083] В некоторых вариантах осуществления в молекуле CAR используется NKG2D  
 ICD (SANERCKSKVVPQRQKQWRTSFDSKKLNLNHNHFESEMEWSHRSRGRIGWM  
 (SEQ ID NO:73);  
 AGCGCGAACGAACGCTGCAAAAGCAAAGTGGTGCCGTGCCGCCAGAAACAGTGGC  
 GCACCAGCTTTGATAGCAAAAACTGGATCTGAACTATAACCATTTTGAAAGCATG



GAATGGAGCCATCGCAGCCGCCGCGGCCGCATTTGGGGCATG (SEQ ID NO:70), или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более % идентична SEQ ID NO:70 или 73.

[0084] В конкретных вариантах осуществления используется кодон-оптимизированный CD27, и один пример представляет собой следующее:

[0085] ATG GCG AGA CCA CAC CCT TGG TGG CTG TGC GTA CTC GGC ACA CTT GTA GGT CTG TCC GCT ACA CCG GCT CCG AAG TCC TGC CCG GAG CGG CAT TAT TGG GCA CAG GGC AAG TTG TGT TGT CAA ATG TGT GAG CCG GGA ACC TTT CTC GTG AAG GAT TGC GAT CAG CAT CGG AAG GCC GCG CAG TGC GAC CCA TGT ATA CCA GGG GTC TCA TTT TCC CCA GAT CAC CAT ACG AGG CCG CAC TGT GAG TCT TGC AGG CAT TGT AAT TCC GGC TTG TTG GTC CGC AAC TGT ACT ATT ACT GCG AAT GCA GAG TGT GCT TGT AGA AAC GGA TGG CAG TGC AGG GAC AAA GAA TGT ACG GAG TGT GAT CCA CTG CCT AAC CCC AGT CTT ACA GCA AGA TCT TCA CAG GCC CTC AGC CCG CAT CCT CAA CCA ACA CAT CTT CCT TAC GTG TCA GAA ATG TTG GAG GCG CGA ACC GCA GGC CAT ATG CAG ACC CTG GCG GAC TTT CGG CAG CTG CCA GCA CGC ACA CTT AGT ACA CAC TGG CCA CCA CAA CGC AGC TTG TGC TCT TCC GAT TTC ATC CGC ATA CTG GTC ATC TTT TCT GGA ATG TTC CTT GTG TTC ACC CTG GCA GGA GCC CTG TTC CTT CAC CAG AGA CGC AAG TAC AGG TCA AAC AAG GGT GAG AGC CCC GTT GAA CCC GCA GAG CCG TGT AGA TAC TCA TGT CCT AGA GAA GAA GAG GGC TCT ACT ATC CCT ATT CAG GAA GAT TAT AGA AAA CCC GAA CCC GCG TGC AGC CCC (SEQ ID NO:13).

[0086] В любом полинуклеотиде по настоящему изобретению может использоваться SEQ ID NO:13 или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более % идентична SEQ ID NO: 13.

[0087] В конкретных вариантах осуществления используется кодон-оптимизированный внеклеточный домен CD27, и один пример представляет собой следующее:

[0088] GCTACACCGGCTCCGAAGTCCTGCCCCGAGCGGCATTATTGGGACACAG GGCAAGTTGTGTTGTCAAATGTGTGAGCCGGGAACCTTTCTCGTGAAGGATTGCGAT CAGCATCGGAAGGCCGCGCAGTGCGACCCATGTATACCAGGGGTCTCATTTTCCCCA GATCACCATACGAGGGCCGCACTGTGAGTCTTGCAAGGCATTGTAATTCCGGCTTGTTG GTCCGCAACTGTACTATTACTGCGAATGCAGAGTGTGCTTGTAGAAACGGATGGCA GTGCAGGGACAAAGAATGTACGGAGTGTGATCCACTGCCTAACCCAGTCTTACAG CAAGATCTTCACAGGCCCTCAGCCCGCATCCTCAACCAACACATCTTCCTTACGTGT CAGAAATGTTGGAGGGCGGAACCGCAGGCCATATGCAGACCCTGGCGGACTTTCGG CAGCTGCCAGCACGCACACTTAGTACACACTGGCCACCACAACGCAGCTTGTGCTCT TCCGATTTTCATCCGC (SEQ ID NO:64)

[0089] В любом полинуклеотиде по настоящему изобретению может использоваться SEQ ID NO:64 или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более % идентична SEQ ID NO:64.

[0090] На фиг. 2А-2Е представлены конкретные примеры конструкций CAR, содержащих определенные компоненты. Данные конструкции представляют собой конкретные примеры, в которых конструкция CAR может содержать полноразмерный CD27 (FL; все 260 аминокислот). В альтернативных случаях, когда полноразмерный CD27 не используется, то можно использовать внеклеточный домен CD27 (CD27 EC), представляющий собой остатки 20-191 CD27. В конкретных вариантах осуществления, когда в CAR используется усеченный CD27, то внутриклеточный костимулирующий домен (ICD) CD27 может не использоваться в CAR и/или трансмембранный домен CD27 (TMD) может не использоваться в CAR.

[0091] На фиг. 2А, пример (1) анти-CD70 CAR включает сигнальный пептид CD27 (SP), полноразмерный CD27 (FL), CD27 TMD, CD27 ICD и CD3дзета. Пример (2) на фиг. 2А включает сигнальный пептид рецептора колониестимулирующего гранулоцитарно-макрофагального фактора (GMSCF-R), кодон-оптимизированный (со) полноразмерный CD27, кодон-оптимизированный трансмембранный домен CD27, кодон-оптимизированный CD27 ICD и CD3дзета. Пример (3) на фиг. 2А включает CD27 SP, полноразмерный CD27, CD27 TMD, CD27 ICD, CD28 ICD и CD3дзета. Пример (4) на фиг. 2А включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный полноразмерный CD27, кодон-оптимизированный полноразмерный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD, CD28 ICD и CD3дзета. Пример (5) на фиг. 2А включает CD27 SP, полноразмерный CD27, CD27 TMD, CD27 ICD, 4-1BB ICD и CD3дзета. Пример (6) включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный полноразмерный CD27, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD, 4-1BB ICD и CD3дзета.

[0092] Пример (7) на фиг. 2В включает CD27 SP, полноразмерный CD27, CD27 TMD, CD27 ICD, DAP10 ICD и CD3дзета. Пример (8) на фиг. 2В включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный полноразмерный CD27, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD, DAP10 ICD и CD3дзета. Пример (9) на фиг. 2В включает CD27 SP, полноразмерный CD27, CD27 TMD, CD27 ICD, DAP12 ICD и CD3дзета. Пример (10) на фиг. 2В включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный полноразмерный CD27, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный ICD CD27, DAP12 ICD и CD3дзета. Пример (11) на фиг. 2В включает CD27 SP, полноразмерный CD27, CD27 TMD, CD27 ICD, NKG2D ICD и CD3дзета. Пример (12) на фиг. 2В включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный полноразмерный CD27, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD, NKG2D ICD и CD3дзета.

[0093] Пример (13) на фиг. 2С включает CD27 SP, внеклеточный домен (EC) CD27, TMD CD27 и CD3дзета. Пример (14) на фиг. 2С включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный TMD и CD3дзета. Пример (15) на фиг. 2С включает CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD и CD3дзета. Пример (16) на фиг. 2С включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD28 TMD и CD3дзета. Пример (17) на фиг. 2С включает CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD, CD28 ICD и CD3дзета. Пример (18) на фиг. 2С включает GMSCF-R SP, кодон-

оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD, CD28 ICD и CD3дзета. Пример (19) на фиг. 2C включает CD27SP, CD27 EC, CD28 TMD, CD28 ICD и CD3дзета. Пример (20) на фиг. 2C включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, CD28 ICD и CD3дзета.

[0094] Пример (21) на фиг. 2D включает CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD, 4-1BB ICD и CD3дзета. Пример (22) на фиг. 2D включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD, 4-1BB ICD и CD3дзета. Пример (23) на фиг. 2D включает CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD, 4-1BB ICD и CD3дзета. Пример (24) на фиг. 2D включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, 4-1BB ICD и CD3дзета. Пример (25) на фиг. 2D включает CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD, DAP10 ICD и CD3дзета. Пример (26) на фиг. 2D включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD, DAP10 ICD и CD3дзета. Пример (27) на фиг. 2D включает CD27 SP, CD27 EC, костимулирующий домен CD28, DAP10 ICD и CD3дзета. Пример (28) на фиг. 2D включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, DAP10 ICD и CD3дзета.

[0095] Пример (29) на фиг. 2E включает CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD, DAP12 ICD и CD3дзета. Пример (30) на фиг. 2E включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD, DAP12 ICD и CD3дзета. Пример (31) на фиг. 2E включает CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD, DAP12 ICD и CD3дзета. Пример (32) на фиг. 2E включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, DAP12 ICD и CD3дзета. Пример (33) на фиг. 2E включает CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD, NKG2D ICD и CD3дзета. Пример (34) на фиг. 2E включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, NKG2D ICD и CD3дзета. Пример (35) на фиг. 2E включает CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD, NKG2D ICD и CD3дзета. Пример (36) на фиг. 2E включает GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, NKG2D ICD и CD3дзета.

[0096] Один пример анти-CD70 CAR по настоящему изобретению содержит SEQ ID NO:1, которая содержит внеклеточный домен CD27 (не подчеркнут в SEQ ID NO:1 ниже), функционально связанный с трансмембранным доменом CD28 (подчеркнут в SEQ ID NO:1 ниже) и сигнальный пептид CD27 (выделен жирным шрифтом в SEQ ID NO:1 ниже):

[0097]**MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGT**  
FLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECAC  
RNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARAGHMQTLA  
DFRQLPARTLSTHWPPQRSRLCSSDFIRFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID  
NO:1)

[0098] Внеклеточный домен CD27 SEQ ID NO:1 содержит следующую последовательность SEQ ID NO:2:

MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKD  
CDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGW  
QCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARAGHMQTLADFRQL  
PARTLSTHWPPQRSRLCSSDFIR.

[0099] Трансмембранный домен CD28 в SEQ ID NO:1 содержит следующую последовательность SEQ ID NO:3:

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFHFWV(TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGG  
AGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG  
(SEQ ID NO:65)).

[0100] Сигнальный пептид CD27 с последовательностью SEQ ID NO:1 содержит следующую последовательность SEQ ID NO:6:

MARPHPWWLCVLGTLVGLS(ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTT  
CTGGGGACCCTGGTGGGGCTCTCA (SEQ ID NO:61)).

[0101] Настоящее изобретение относится к клеткам (включая иммунные клетки, такие как NK-клетки), которые содержат вектор, кодирующий, по меньшей мере, один CAR, и CAR может быть, например, первого поколения, второго поколения или третьего или последующего поколения. CAR может быть или может не быть биспецифическим в отношении двух или более различных антигенов, одним из которых является CD70. В конкретных вариантах осуществления CAR не является бивалентным тандемным CAR. CAR может содержать один или более костимулирующих доменов. Каждый костимулирующий домен может включать костимулирующий домен любого одного или более из, например, членов суперсемейства TNFR, CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), DAP10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, любой ITAM-содержащий сигнальный домен или их комбинации, например. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит CD3дзета. В некоторых вариантах осуществления в CAR отсутствует один или несколько специфических костимулирующих доменов; например, в CAR может отсутствовать 4-1BB и/или CD28.

[0102] В конкретных вариантах осуществления полипептид CAR в клетках содержит внеклеточный спейсерный домен, который связывает антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен. Внеклеточные спейсерные домены могут включать, помимо прочего, Fc-фрагменты антител или их фрагменты или производные, шарнирные области антител или их фрагменты или производные, области CH2 антител, области CH3 антител, искусственные спейсерные последовательности или их комбинации. Примеры внеклеточных спейсерных доменов включают, не ограничиваясь этим, CD8-альфа-шарнирную область, CD28, искусственные спейсеры, полученные из полипептидов, таких как Gly3, или домены CH1, CH3 IgG (такие как IgG1 или IgG4 человека). В определенных случаях внеклеточный спейсерный домен может содержать (i) шарнирную область, области CH2 и CH3 IgG4, (ii) шарнирную область IgG4, (iii) шарнирную область и CH2 IgG4, (iv) шарнирную область CD8-альфа, (v) шарнирную область, области CH2 и CH3 IgG1, (vi) шарнирную область IgG1 или (vii) шарнирную область и CH2 IgG1, (viii) шарнирную область CD28 или их комбинацию.

[0103] В конкретных вариантах осуществления шарнирная область происходит из IgG1, и в некоторых аспектах полипептид CAR содержит конкретную аминокислотную последовательность шарнирной области IgG1 или кодируется конкретной

последовательностью нуклеиновой кислоты шарнирной области IgG1.

[0104] В конкретных вариантах осуществления шарнирная область происходит из CD28, и в некоторых аспектах полипептид CAR содержит конкретную аминокислотную последовательность шарнирной области CD28 или кодируется конкретной последовательностью нуклеиновой кислоты шарнирной области CD28.

[0105] Трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления происходит либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, то домен в некоторых аспектах происходит из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают в себя те, которые получены из (т.е. содержат по меньшей мере, трансмембранную(ые) область(и) из) альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3дзета, CD3эпсилон, CD3гамма, CD3дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D и молекул DAP, таких как DAP10 или DAP12. Альтернативно, трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления является синтетическим. В некоторых аспектах синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах триплет фенилаланина, триптофана и валина может быть обнаружен на каждом конце синтетического трансмембранного домена.

[0106] В некоторых вариантах осуществления CD70-специфический CAR может коэкспрессироваться с одним или несколькими цитокинами для улучшения персистенции при низком количестве опухолеассоциированного антигена. Например, CAR может коэкспрессироваться с одним или несколькими цитокинами, такими как IL-7, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21, IL-7, GMCSF или их сочетание.

[0107] В конкретных примерах анти-CD70 CAR может иметь следующую нуклеотидную последовательность:

[0108] **CD27tr28tdmCD3zIL15:**

[0109] ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCCTGGTG  
GGGCTCTCAGTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCA  
GGGAAAGCTGTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCCTCGTGAAGGACTGTG  
ACCAGCATAGAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTGCATACCGGGGGTCTCCTTCTCTC  
CTGACCACCACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTGCGGCACTGTAACCTCTGGTCTTC  
TCGTTTCGCAACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTCGCAATGGCTGGC  
AGTGCAGGGACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCCAAACCTTCGCTGACC  
GCTCGGTCGTCTCAGGCCCTGAGCCCACACCCTCAGCCCACCCACTTACCTTATGTC  
AGTGAGATGCTGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAG  
GCAGCTGCCTGCCCGGACTCTCTCTACCCACTGGCCACCCCAAAGATCCCTGTGCAG  
CTCCGATTTTATTCGCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTAT  
AGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG (SEQ ID NO:15)

[0110] Соответствующая аминокислотная последовательность для **CD27tr28tdmCD3zIL15** представляет собой следующее:

[0111]MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFL  
VKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRN  
GWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARAGHMQTLADFR  
QLPARTLSTHWPPQRSRLCSSDFIRFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID  
NO:38)

[0112]**CD27Tr28tmd41BBied3zIL15:**

[0113]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
ACGTGAAGGCTGCCGACCCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCTGGTGGGGCTCTCA  
GCTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCAGGGAAAGCT  
GTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCTCGTGAAGGACTGTGACCAGCATA  
GAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTGCATACCGGGGGTCTCCTTCTCTCCTGACCACC  
ACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTGCGGCACTGTAACCTCTGGTCTTCTCGTTCGCA  
ACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTCGCAATGGCTGGCAGTGCAGGG  
ACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCCAAACCCTTCGCTGACCGCTCGGTCTGT  
CTCAGGCCCTGAGCCCACACCCTCAGCCCACCCACTTACCTTATGTCAGTGAGATGC  
TGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAGGCAGCTGCCT  
GCCCCGACTCTCTCTACCCACTGGCCACCCCCAAAGATCCCTGTGCAGCTCCGATTTT  
ATTCGCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAG  
TAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATA  
TATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGT  
AGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAAACGCGTGAAGTT  
CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACG  
AGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGG  
GACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA  
ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGG  
CGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCA  
CCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGT  
GTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCA  
TGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGC  
TGCTGAACAGCCACTTCTGACCGAGGCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCT  
TCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTG  
AAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGA  
GAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAAC  
TGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGAGAGAAC  
CTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGG

CTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCT  
TCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:16)

[0114] Соответствующая аминокислотная последовательность для **CD27Tr28tmd41BBicd3zIL15** представляет собой следующее:

[0115]MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTPTALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
CSRMARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCD  
QHRKAAQCDPCIPGVFSFDPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCR  
DKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPAR  
TLSTHWPPQRSLLCSSDFIRFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQP  
FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR  
EEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH  
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSI  
SIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT  
LYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGC  
KECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:39)

[0116]**GSPco27Tr28tmd41BBicCD3zIL15:**

[0117]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCC  
TGATCCCAGCTACACCGGCTCCGAAGTCCTGCCCGGAGCGGCATTATTGGGCACAG  
GGCAAGTTGTGTTGTCAAATGTGTGAGCCGGGAACCTTTCTCGTGAAGGATTGCGAT  
CAGCATCGGAAGGCCGCGCAGTGCGACCCATGTATAACCAGGGGTCTCATTTTCCCCA  
GATCACCATACGAGGCCGCACTGTGAGTCTTGCAGGCATTGTAATTCCGGCTTGTTG  
GTCCGCAACTGTACTATTACTGCGAATGCAGAGTGTGCTTGTAGAAACGGATGGCA  
GTGCAGGGACAAAGAATGTACGGAGTGTGATCCACTGCCTAACCCCAGTCTTACAG  
CAAGATCTTCACAGGCCCTCAGCCCGCATCCTCAACCAACACATCTTCCTTACGTGT  
CAGAAATGTTGGAGGCGCGAACCGCAGGCCATATGCAGACCCTGGCGGACTTTCGG  
CAGCTGCCAGCACGCACACTTAGTACACACTGGCCACCACAACGCAGCTTGTGCTCT  
TCCGATTTTCATCCGCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATA  
GCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAAC  
TCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG  
ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAAACGC  
GTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT  
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGAC  
GTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGG

CCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGA  
 TGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGT  
 ACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGG  
 ACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCC  
 CGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCT  
 GTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCGGCATCCACGTGTTTCATCCT  
 GGGCTGCTTCAGCGCCGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCA  
 GCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTG  
 TACACCGAGAGCGACGTGCACCCCACTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCT  
 GCTGGAACCTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCG  
 TGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACC  
 GAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTC  
 TGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:17)

[0118] Соответствующая аминокислотная последовательность для **GSPco27Tr28tmd41BBicCD3zIL15** представляет собой следующее:

[0119]MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTPTALKVDGIAAWIHAHVKAAADPGGGPSSRLP  
 CSRMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDC  
 DQHRKAAQCPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQ  
 CRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLP  
 ARTLSTHWPPQRSCLSSDFIRFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFK  
 QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG  
 RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK  
 GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHL  
 RSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSGAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHID  
 ATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTES  
 GCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:40)

[0120]**CD27Tr28tmdDAP10icd3z15:**

[0121]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
 TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCCTGGTGGGGCTCTCA  
 GCTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCAGGGAAAGCT  
 GTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCCTCGTGAAGGACTGTGACCAGCATA  
 GAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTGCATACCGGGGGTCTCCTTCTCTCCTGACCACC  
 ACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTGCGGCACTGTAACCTCTGGTCTTCTCGTTCGCA  
 ACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTCGCAATGGCTGGCAGTGCAGGG



ACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCCAAACCCTTCGCTGACCGCTCGGTCGT  
 CTCAGGCCCTGAGCCCACACCCTCAGCCCACCCACTTACCTTATGTCAGTGAGATGC  
 TGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAGGCAGCTGCCT  
 GCCCGGACTCTCTCTACCCACTGGCCACCCCAAAGATCCCTGTGCAGCTCCGATTTT  
 ATTCGCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAG  
 TAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGCTTTGCGCACGCCCACGCCGCAGCCCCG  
 CCCAAGAAGATGGCAAAGTCTACATCAACATGCCAGGCAGGGGCAAACGCGTGAA  
 GTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA  
 ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGC  
 CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGT  
 ACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAA  
 AGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAG  
 CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGC  
 AGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGC  
 CCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCC  
 TGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCT  
 GCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGAC  
 CTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACAC  
 CGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGG  
 AACTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAG  
 AACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAG  
 CGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAG  
 AGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:18)

[0122] Соответствующая аминокислотная последовательность для **CD27Tr28tmdDAP10icd3z15** представляет собой следующее:

[0123]MTRVTNSPSLQAHLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTP TALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMARPHPW LCVLGLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCD  
 QHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCR  
 DKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPAR  
 TLSTHWPPQ RSLC SSDFIRFWVLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVLCARPRRSPAQEDG  
 KVIYNMPGRGKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG  
 GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA  
 LHMQUALPPRGPQCTNYALLKL AGDVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEA  
 GIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK  
 CFLLELQVISLESGDASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSF  
 VHIVQMFINTS (SEQ ID NO:41)

[0124]**GSPco27Tr28tmdDAP10IL15:**

[0125]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
 TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA

CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACACACCCAGCATTCTCC  
 TGATCCCAGCTACACCGGCTCCGAAGTCCTGCCCCGAGCGGCATTATTGGGCACAG  
 GGCAAGTTGTGTTGTCAAATGTGTGAGCCGGGAACCTTTCTCGTGAAGGATTGCGAT  
 CAGCATCGGAAGGCCGCGCAGTGCGACCCATGTATACCAGGGGTCTCATTTTCCCCA  
 GATCACCATACGAGGGCCGCACTGTGAGTCTTGCAAGGCATTGTAATTCCGGCTTGTTG  
 GTCCGCAACTGTACTATTACTGCGAATGCAGAGTGTGCTTGTAGAAACGGATGGCA  
 GTGCAGGGACAAAGAATGTACGGAGTGTGATCCACTGCCTAACCCAGTCTTACAG  
 CAAGATCTTCACAGGCCCTCAGCCCGCATCCTCAACCAACACATCTTCCTTACGTGT  
 CAGAAATGTTGGAGGGCGGAACCGCAGGCCATATGCAGACCCTGGCGGACTTTCGG  
 CAGCTGCCAGCACGCACACTTAGTACACACTGGCCACCACAACGCAGCTTGTGCTCT  
 TCCGATTTTCATCCGCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATA  
 GCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGCTTTGCGCACGCCACGCCG  
 CAGCCCCGCCCAAGAAGATGGCAAAGTCTACATCAACATGCCAGGCAGGGGCAAAC  
 GCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAG  
 CTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAG  
 ACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAA  
 GGCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGG  
 GATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA  
 GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCG  
 GACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATC  
 CCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTAC  
 CTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCGGCATCCACGTGTTTCATC  
 CTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGAT  
 CAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCC  
 TGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTT  
 CTGCTGGAACCTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACAC  
 CGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGA  
 CCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTT  
 TCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID  
 NO:19)

[0126] Соответствующая аминокислотная последовательность для  
**GSPco27Tr28tmdDAP10IL15** представляет собой следующее:

[0127] MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTPALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDC  
 DQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQ

CRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLP  
 ARTLSTHWPPQRSRLCSSDFIRFWLVVVGGVLACYSLVTVAFIIFWVLCARPRRSPAQE  
 DGKVYINMPGRGKRKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPE  
 MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT  
 YDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFL  
 TEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA  
 MKCFLLELQVISLESGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFL  
 QSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:42)

[0128]**CD27Tr28tmdDAP12icd3z15:**

[0129]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
 TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCCTGGTGGGGCTCTCA  
 GCTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCAGGGAAAGCT  
 GTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCCTCGTGAAGGACTGTGACCAGCATA  
 GAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTGATACCGGGGGTCTCCTTCTCTCCTGACCACC  
 ACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTCGGCACTGTAACCTCTGGTCTTCTCGTTCGCA  
 ACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTCGCAATGGCTGGCAGTGCAGGG  
 ACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCCAAACCCTTCGCTGACCGCTCGGTCTG  
 CTCAGGCCCTGAGCCCACACCCTCAGCCCACCCACTTACCTTATGTCAGTGAGATGC  
 TGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAGGCAGCTGCCT  
 GCCCGGACTCTCTTACCCACTGGCCACCCCAAAGATCCCTGTGCAGCTCCGATTTT  
 ATTCGCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAG  
 TAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGTACTTCCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGG  
 GCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCG  
 CTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACA  
 GAGGCCGTATTACAAAAACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGT  
 ACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGA  
 GTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGA  
 GAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC  
 GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCAC  
 GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCAC  
 ATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTG  
 GCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCG  
 GAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGA  
 GGCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGA  
 GGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGA

GCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAG  
 GTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAAGTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGG  
 CGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCC  
 TGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGA  
 AGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTCA  
 TCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:20)

[0130] Соответствующая аминокислотная последовательность для **CD27Tr28tmdDAP12icd3z15** представляет собой следующее:

[0131]MTRVTNSPSLQAHLLQALYLQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTPTALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMARPHPWWLCLVGLTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGLKCCQMCEPGTFLVKDCD  
 QHRKAAQCDPCIPGVFSFDPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCR  
 DKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPAR  
 TLSTHWPPQRSLSDFIRFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVYFLGRLVPRGRGA  
 AEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYKKRVKFSRSADAPAYQQGQN  
 QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG  
 MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNP  
 GPMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKI  
 EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLIILANNS  
 LSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:43)

[0132]**GSPco27Tr28tmddap12icd15:**

[0133]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
 TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCC  
 TGATCCCAGCTACACCGGCTCCGAAGTCCTGCCCGGAGCGGCATTATTGGGCACAG  
 GGCAAGTTGTGTTGTCAAATGTGTGAGCCGGGAACCTTTCTCGTGAAGGATTGCGAT  
 CAGCATCGGAAGGCCGCGCAGTGCGACCCATGTATAACCAGGGGTCTCATTTTCCCA  
 GATCACCATACGAGGCCGCACTGTGAGTCTTGCAGGCATTGTAATTCCGGCTTGTTG  
 GTCCGCAACTGTACTATTACTGCGAATGCAGAGTGTGCTTGTAGAAACGGATGGCA  
 GTGCAGGGACAAAGAATGTACGGAGTGTGATCCACTGCCTAACCCAGTCTTACAG  
 CAAGATCTTCACAGGCCCTCAGCCCGCATCCTCAACCAACACATCTTCCTTACGTGT  
 CAGAAATGTTGGAGGCGCGAACCGCAGGCCATATGCAGACCCTGGCGGACTTTCGG  
 CAGCTGCCAGCACGCACACTTAGTACACACTGGCCACCACAACGCAGCTTGTGCTCT  
 TCCGATTTTCATCCGCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATA  
 GCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGTACTTCCTGGGCCGGCTGGT  
 CCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAAACAGCGTATCACTGAG

ACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCT  
 CAACACACAGAGGCCGTATTACAAAAACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAC  
 GCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACG  
 AAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGG  
 GGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAG  
 ATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGG  
 CAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG  
 ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTC  
 TCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAG  
 CCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCAC  
 TTCCTGACCGAGGCCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTG  
 CCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGG  
 ACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCAC  
 CCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTGATCAGC  
 CTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGC  
 CAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGC  
 GAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGT  
 GCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:21)

[0134] Соответствующая аминокислотная последовательность для **GSPco27Tr28tmddap12icd15** представляет собой следующее:

[0135]MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTPALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDC  
 DQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQ  
 CRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLP  
 ARTLSTHWPPQRSLSLCSDFIRFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVYFLGRLVPRGR  
 GAAEAATRQKQKITETESPYQELQGQSRSDVYSDLNTQRPYYKKRVKFSRSADAPAYQQG  
 QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE  
 IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLADVES  
 NPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLK  
 KIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLIILAN  
 NSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:44)

[0136]**CD27Tr28tmdNKG2Dic3z15**:

[0137]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
 TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCCTGGTGGGGCTCTCA

GCTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCAGGGAAAGCT  
 GTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCCTCGTGAAGGACTGTGACCAGCATA  
 GAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTGCCATACCGGGGGTCTCCTTCTCTCCTGACCACC  
 ACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTCGGCACTGTAACTCTGGTCTTCTCGTTTCGCA  
 ACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTCGCAATGGCTGGCAGTGCAGGG  
 ACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCCAAACCCTTCGCTGACCGCTCGGTCTGT  
 CTCAGGCCCTGAGCCACACCCTCAGCCACCCACTTACCTTATGTCAGTGAGATGC  
 TGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAGGCAGCTGCCT  
 GCCCGGACTCTCTTACCCACTGGCCACCCCAAAGATCCCTGTGCAGCTCCGATTTT  
 ATTCGCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAG  
 TAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGCGCGAACGAACGCTGCAAAAAGCAAA  
 GTGGTGCCGTGCCGCCAGAAACAGTGGCGCACCAGCTTTGATAGCAAAAAACTGGA  
 TCTGAACTATAACCATTTTGAAGCATGGAATGGAGCCATCGCAGCCGCCGCGGCC  
 GCATTTGGGGCATGAAACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTAC  
 CAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA  
 CGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGA  
 AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG  
 AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGA  
 TGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACAT  
 GCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGC  
 TGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGGCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGA  
 GCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGG  
 CCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGAGG  
 CCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGC  
 ATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCACAGCTGCAAGGT  
 GACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAAGTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCG  
 ACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTG  
 AGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAG  
 AGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCA  
 ACACCAGCTGA (SEQ ID NO:22)

[0138] Соответствующая аминокислотная последовательность для  
**CD27Tr28tmdNKG2Dic3z15** представляет собой следующее:

[0139] MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTPALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMARPHPWWLVCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCD  
 QHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCR  
 DKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPAR  
 TLSTHWPPQRSLSDFIRFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVSANERCKSKVVPCR  
 QKQWRTSFDKKLDLNYNHFESMEWSHRSRRGRIWGMKRVKFSRSADAPAYQQGQN  
 QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG

MKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNP  
GPMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKI  
EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLIILANNS  
LSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:45)

[0140]**GSPco27Tr28tmdNKG2Died3z15:**

[0141]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
ACGTGAAGGCTGCCGACCCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCC  
TGATCCCAGCTACACCGGCTCCGAAGTCCTGCCCGGAGCGGCATTATTGGGCACAG  
GGCAAGTTGTGTTGTCAAATGTGTGAGCCGGGAACCTTTCTCGTGAAGGATTGCGAT  
CAGCATCGGAAGGCCGCGCAGTGCGACCCATGTATAACCAGGGGTCTCATTTTCCCCA  
GATCACCATACGAGGCCGCACTGTGAGTCTTGCAGGCATTGTAATTCCGGCTTGTTG  
GTCCGCAACTGTACTATTACTGCGAATGCAGAGTGTGCTTGTAGAAACGGATGGCA  
GTGCAGGGACAAAGAATGTACGGAGTGTGATCCACTGCCTAACCCCAGTCTTACAG  
CAAGATCTTCACAGGCCCTCAGCCCGCATCCTCAACCAACACATCTTCCTTACGTGT  
CAGAAATGTTGGAGGCGCGAACCGCAGGCCATATGCAGACCCTGGCGGACTTTCGG  
CAGCTGCCAGCACGCACACTTAGTACACACTGGCCACCACAACGCAGCTTGTGCTCT  
TCCGATTTTCATCCGCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATA  
GCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGCGCGAACGAACGCTGCA  
AAAGCAAAGTGGTGCCGTGCCGCCAGAAACAGTGGCGCACCAGCTTTGATAGCAAA  
AACTGGATCTGAACTATAACCATTTTGAAGCATGGAATGGAGCCATCGCAGCCG  
CCGCGGCCGCATTTGGGGCATGAAACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCC  
CCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGA  
GAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA  
AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAA  
GATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAG  
GGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC  
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTT  
GAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCC  
ACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCC  
TGACCGAGGCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCA  
AGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTG  
ATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCAG  
CTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTGATCAGCCTGGA  
AAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACA  
ACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGA

ACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGA  
TGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:23)

[0142] Соответствующая аминокислотная последовательность для **GSPco27Tr28tmdNKG2Dcd3z15** представляет собой следующее:

[0143]MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTPTALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
CSRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDC  
DQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQ  
CRDKECTECDLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLP  
ARTLSTHWPPQRS LCSSDFIRFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVSANERCKSKVV  
PCRQKQWRTSFD SKKLDLNYNHFESMEWSHRSRGRIWGMKRVKFSRSADAPAYQQG  
QNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE  
IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLADVES  
NPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLK  
KIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDVTENLILAN  
NSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:46)

[0144]**CD27Tr41BBcd3z15:**

[0145]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCCTGGTGGGGCTCTCA  
GCTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCAGGGAAAGCT  
GTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCCTCGTGAAGGACTGTGACCAGCATA  
GAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTG CATACCGGGGGTCTCCTTCTCTCCTGACCACC  
ACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTCGGCACTGTA ACTCTGGTCTTCTCGTTCGCA  
ACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTCGCAATGGCTGGCAGTGCAGGG  
ACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCAAACCCTTCGCTGACCGCTCGGTCTGT  
CTCAGGCCCTGAGCCCACACCCTCAGCCCACCCACTTACCTTATGTCAGTGAGATGC  
TGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAGGCAGCTGCCT  
GCCCCGACTCTCTTACCCACTGGCCACCCCAAAGATCCCTGTGCAGCTCCGATTTT  
ATTCGCATCCTTGTGATCTTCTCTGGAATGTTCTTGT TTTTACCCTGGCCGGGGCCC  
TGTTCTCCATAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTA  
TGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA  
GAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAAACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACG  
CCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGA  
AGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGG  
GAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGA



TAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC  
 AAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGA  
 CGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCT  
 CTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGC  
 CCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACT  
 TCCTGACCGAGGCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGC  
 CCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGA  
 CCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACC  
 CCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTGATCAGCC  
 TGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCC  
 AACACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCG  
 AGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTG  
 CAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:24)

[0146] Соответствующая аминокислотная последовательность для **CD27Tr41BBid3z15** представляет собой следующее:

[0147]MTRVTNSPSLQAHQLALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHYPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTPTALKVDGIAAWIHAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMARPHPWVLCVLGTLVGLSATPAKSCPERHYWAQGLCCQMCEPGTFLVKDCD  
 QHRKAAQCDPCIPGVFSFDPDHHTRPHCESCRHCNSGLLRNCTITANAECACRNGWQCR  
 DKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPAR  
 TLSTHWPPQRSLSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT  
 TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL  
 KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG  
 LSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNP GPMRISKPHLRSISIQCYLC  
 LLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDV  
 HPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELE  
 EKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:47)

[0148]**GSPco27Tr41BBid3z15**:

[0149]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
 TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCC  
 TGATCCCAGCTACACCGGCTCCGAAGTCCTGCCCGGAGCGGCATTATTGGGCACAG  
 GGCAAGTTGTGTTGTCAAATGTGTGAGCCGGGAACCTTTCTCGTGAAGGATTGCGAT  
 CAGCATCGGAAGGCCGCGCAGTGCGACCCATGTATACCAGGGGTCTCATTTTCCCCA  
 GATCACCATACGAGGCCGCACTGTGAGTCTTGCAAGGATTGTAATTCCGGCTTGTTG  
 GTCCGCAACTGTACTATTACTGCGAATGCAGAGTGTGCTTGTAGAAACGGATGGCA

GTGCAGGGACAAAGAATGTACGGAGTGTGATCCACTGCCTAACCCCAGTCTTACAG  
 CAAGATCTTCACAGGCCCTCAGCCCGCATCCTCAACCAACACATCTTCCTTACGTGT  
 CAGAAATGTTGGAGGGCGGAACCGCAGGCCATATGCAGACCCTGGCGGACTTTCGG  
 CAGCTGCCAGCACGCACACTTAGTACACACTGGCCACCACAACGCAGCTTGTGCTCT  
 TCCGATTTTCATCCGCATACTGGTCATCTTTTCTGGAATGTTCTTGTGTTACCCCTGG  
 CAGGAGCCCTGTTCTTTCACAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAA  
 CAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG  
 ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAAACGCGTGAAGTTCAGCAGG  
 AGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA  
 TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTG  
 AGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACT  
 GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGC  
 CGGAGGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA  
 CACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAA  
 TTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCAT  
 TAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAA  
 CAGCCACTTCCTGACCGAGGCCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGC  
 CGGACTGCCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGA  
 TCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGAC  
 GTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTG  
 ATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCAT  
 CCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAA  
 GAGTGCGAGGAAGTGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCA  
 CATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:25)

[0150] Соответствующая аминокислотная последовательность для **GSPco27Tr41BBied3z15** представляет собой следующее:

[0151]MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTPALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMILLVTSLLLCELPHPAFLLIPATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDC  
 DQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQ  
 CRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLP  
 ARTLSTHWPPQRS LCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHKRGRKKLLYIFKQPFMRPV  
 QTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV  
 LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLY  
 QGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKL AGDVESNPGPMRISKPHLRSISIQC  
 YLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTE  
 SDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECE  
 ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:48)

[0152]**CD27TrCD3ZIL15:**

[0153]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC

TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCCTGGTGGGGCTCTCA  
 GCTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCAGGGAAAGCT  
 GTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCCTCGTGAAGGACTGTGACCAGCATA  
 GAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTGATACCGGGGGTCTCCTTCTCTCCTGACCACC  
 ACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTCGGCACTGTAACTCTGGTCTTCTCGTTCGCA  
 ACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTCGCAATGGCTGGCAGTGCAGGG  
 ACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCCAAACCCTTCGCTGACCGCTCGGTCTGT  
 CTCAGGCCCTGAGCCCACACCCTCAGCCCACCCACTTACCTTATGTCAGTGAGATGC  
 TGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAGGCAGCTGCCT  
 GCCCGGACTCTCTTACCCACTGGCCACCCCAAAGATCCCTGTGCAGCTCCGATTTT  
 ATTCGCATCCTTGTGATCTTCTCTGGAATGTTCTTGTTTTACCCTGGCCGGGGCCC  
 TGTTCTCCATAAACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAG  
 CAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGA  
 TGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGG  
 AAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG  
 CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGG  
 CCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCA  
 GGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGG  
 AGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCA  
 TCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCG  
 GCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGAGGCCA  
 ACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATG  
 CACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAGGTGAC  
 CGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAAGTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACG  
 CCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGC  
 AGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGA  
 AGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACA  
 CCAGCTGA (SEQ ID NO:26)

[0154] Соответствующая аминокислотная последовательность для **CD27TrCD3ZIL15** представляет собой следующее:

[0155] MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTP TALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCD  
 QHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCR  
 DKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPAR

TLSTHWPPQRS L CSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHKRVKFSRSADAPAYQQGQNG  
 LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM  
 KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPG  
 PMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIE  
 DLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHD TVENLIILANNSL  
 SSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:49)

[0156]**GSPco27Tr3z15:**

[0157]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
 TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCC  
 TGATCCCAGCTACACCGGCTCCGAAGTCCTGCCCGGAGCGGCATTATTGGGCACAG  
 GGCAAGTTGTGTTGTCAAATGTGTGAGCCGGGAACCTTTCTCGTGAAGGATTGCGAT  
 CAGCATCGGAAGGCCGCGCAGTGCGACCCATGTATAACCAGGGGTCTCATTTTCCCCA  
 GATCACCATACGAGGCCGCACTGTGAGTCTTGCAGGCATTGTAATTCCGGCTTGTTG  
 GTCCGCAACTGTACTATTACTGCGAATGCAGAGTGTGCTTGTAGAAACGGATGGCA  
 GTGCAGGGACAAAGAATGTACGGAGTGTGATCCACTGCCTAACCCAGTCTTACAG  
 CAAGATCTTCACAGGCCCTCAGCCCGCATCCTCAACCAACACATCTTCCTTACGTGT  
 CAGAAATGTTGGAGGCGCGAACCGCAGGCCATATGCAGACCCTGGCGGACTTTCGG  
 CAGCTGCCAGCACGCACACTTAGTACACACTGGCCACCACAACGCAGCTTGTGCTCT  
 TCCGATTTTCATCCGCATACTGGTCATCTTTTCTGGAATGTTCTTGTGTTACCCCTGG  
 CAGGAGCCCTGTTCTTCACCGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCG  
 TACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGA  
 GTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGA  
 GAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC  
 GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGGCAC  
 GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCAC  
 ATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTG  
 GCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCG  
 GAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCTGACCGA  
 GGCCGGCATCCACGTGTTATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGA  
 GGCCAACCTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGA  
 GCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAG  
 GTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGG  
 CGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCC  
 TGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGA  
 AGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTCA

TCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:27)

[0158] Соответствующая аминокислотная последовательность для **GSPco27Tr3z15** представляет собой следующее:

[0159]MTRVTNSPSLQAHQLALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHYPYRVGD  
TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTP TALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
CSRMLLLVTSLLLCELPHPAFL LIPATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDC  
DQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQ  
CRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLP  
ARTLSTHWPPQRS LCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHKRVKFSRSADAPAYQQGQ  
NQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI  
GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESN  
PGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKK  
IEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHD TVENLIILANNS  
LSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:50)

[0160]**CD27TrCD28icd3z15:**

[0161]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
ACGTGAAGGCTGCCGACCCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCCTGGTGGGGCTCTCA  
GCTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCAGGGAAAGCT  
GTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCCTCGTGAAGGACTGTGACCAGCATA  
GAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTG CATACCGGGGGTCTCCTTCTCTCCTGACCACC  
ACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTCGGCACTGTA ACTCTGGTCTTCTCGTTCGCA  
ACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTCGCAATGGCTGGCAGTGCAGGG  
ACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCCAAACCCTTCGCTGACCGCTCGGTCTGT  
CTCAGGCCCTGAGCCCACACCCTCAGCCCACCCACTTACCTTATGTCAGTGAGATGC  
TGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAGGCAGCTGCCT  
GCCCCGACTCTCTTACCCACTGGCCACCCCCAAAGATCCCTGTGCAGCTCCGATTTT  
ATTCGCATCCTTGTGATCTTCTCTGGAATGTTCTTGT TTTTACCCTGGCCGGGGCCC  
TGTTCTCCATAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGA CTACATGAACATG  
ACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGC  
GACTTCGCAGCCTATCGCTCACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC  
GTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGG  
AGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCG  
AGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGG  
CGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCA  
CGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCA

CATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATT  
 GGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGC  
 GGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCG  
 AGGCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCG  
 AGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAG  
 AGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAA  
 GGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCG  
 GCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGC  
 CTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGG  
 AAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTC  
 ATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:28)

[0162] Соответствующая аминокислотная последовательность для **CD27TrCD28icd3z15** представляет собой следующее:

[0163]MTRVTNSPSLQAHLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHYPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTPTALKVDGIAAWIHAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCD  
 QHRKAAQCDPCIPGVFSFDPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCR  
 DKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPAR  
 TLSTHWPPQRSLSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHRSKRSRLHSDYMNMTPRRPG  
 PTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR  
 RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST  
 ATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLL  
 NSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPS  
 CKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEKN  
 IKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:51)

[0164]**GSPco27Tr28CD3z15**:

[0165]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
 TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCC  
 TGATCCCAGCTACACCGGCTCCGAAGTCCTGCCCGGAGCGGCATTATTGGGCACAG  
 GGCAAGTTGTGTTGTCAAATGTGTGAGCCGGGAACCTTTCTCGTGAAGGATTGCGAT  
 CAGCATCGGAAGGCCGCGCAGTGCGACCCATGTATACCAGGGGTCTCATTTTCCCCA  
 GATCACCATAACGAGGCCGCACTGTGAGTCTTGACAGGCATTGTAATTCCGGCTTGTTG  
 GTCCGCAACTGTACTATTACTGCGAATGCAGAGTGTGCTTGTAGAAACGGATGGCA  
 GTGCAGGGACAAAGAATGTACGGAGTGTGATCCACTGCCTAACCCAGTCTTACAG  
 CAAGATCTTCACAGGCCCTCAGCCCGCATCCTCAACCAACACATCTTCCTTACGTGT

CAGAAATGTTGGAGGCGCGAACCGCAGGCCATATGCAGACCCTGGCGGACTTTCGG  
 CAGCTGCCAGCACGCACACTTAGTACACACTGGCCACCACAACGCAGCTTGTGCTCT  
 TCCGATTTTCATCCGCATACTGGTCATCTTTTCTGGAATGTTCTTGTGTTACCCCTGG  
 CAGGAGCCCTGTTCTTTCACAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGA CTAC  
 ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCC  
 CCACCACGCGACTTTCGCAGCCTATCGCTCACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGA  
 CGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGAC  
 GAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGG  
 GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAA  
 GATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGG  
 GCAAGGGGCGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC  
 GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCT  
 CTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAA  
 GCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCA  
 CTTCTGACCGAGGCGCGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACT  
 GCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAG  
 GACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCA  
 CCCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTGATCAG  
 CCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGG  
 CCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTG  
 CGAGGAACCTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCG  
 TGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:29)

[0166] Соответствующая аминокислотная последовательность для **GSPco27Tr28CD3z15** представляет собой следующее:

[0167]MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTP TALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMILLVTSLLLCELPHPAFLLIPATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDC  
 DQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQ  
 CRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLP  
 ARTLSTHWPPQRS LCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHRSKRSRLLHSDYMNMPR  
 RPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL  
 DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALHMQALPPRG PQCTNYALLKL AGDVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYL  
 CLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESD  
 VHPSCKV TAMKCFLELQVISLES GDASIHTVENLILANNSLS SNGNVTESGCKECEEL  
 EEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:52)

[0168]**CD27TrCD28tmdicd3z15**:

[0169]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
 TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC

CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCCTGGTGGGGCTCTCA  
 GCTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCAGGGAAAGCT  
 GTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCCTCGTGAAGGACTGTGACCAGCATA  
 GAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTGATACCGGGGGTCTCCTTCTCTCCTGACCACC  
 ACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTCGGCACTGTAACCTCTGGTCTTCTCGTTGCA  
 ACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTCGCAATGGCTGGCAGTGCAGGG  
 ACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCCAAACCCTTCGCTGACCGCTCGGTCTG  
 CTCAGGCCCTGAGCCCACACCCTCAGCCCACCCACTTACCTTATGTCAGTGAGATGC  
 TGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAGGCAGCTGCCT  
 GCCCGGACTCTCTTACCCACTGGCCACCCCAAAGATCCCTGTGCAGCTCCGATTTT  
 ATTCGCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAG  
 TAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACA  
 GTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAG  
 CCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCACGCGTGAAGTTCAGCAGG  
 AGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA  
 TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTG  
 AGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACT  
 GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGC  
 CGGAGGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA  
 CACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAA  
 TTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGGCCATGCGCAT  
 TAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAA  
 CAGCCACTTCCTGACCGAGGCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGC  
 CGGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGA  
 TCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGAC  
 GTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTG  
 ATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCAT  
 CCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAA  
 GAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCA  
 CATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:30)

[0170] Соответствующая аминокислотная последовательность для **CD27TrCD28tmdicd3z15** представляет собой следующее:

[0171] MTRVTNSPSLQ A H L Q A L Y L V Q H E V W R P L A A A Y Q E Q L D R P V V P H P Y R V G D  
 T V W V R R H Q T K N L E P R W K G P Y T V L L T P T A L K V D G I A A W I H A A H V K A A D P G G G P S S R L P  
 C S R M A R P H P W W L C V L G T L V G L S A T P A P K S C P E R H Y W A Q G K L C C Q M C E P G T F L V K D C D  
 Q H R K A A Q C D P C I P G V S F S P D H H T R P H C E S R H C N S G L L V R N C T I T A N A E C A C R N G W Q C R  
 D K E C T E C D P L P N P S L T A R S S Q A L S P H P Q P T H L P Y V S E M L E A R T A G H M Q T L A D F R Q L P A R



TLSTHWPPQRSLSDFIRFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM  
 NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE  
 EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH  
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSI  
 SIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT  
 LYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGC  
 KECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:53)

[0172]**GSPco27Tr28tmdicCD3z15:**

[0173]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
 TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCC  
 TGATCCCAGCTACACCGGCTCCGAAGTCCTGCCCCGAGCGGCATTATTGGGCACAG  
 GGCAAGTTGTGTTGTCAAATGTGTGAGCCGGGAACCTTTCTCGTGAAGGATTGCGAT  
 CAGCATCGGAAGGCCGCGCAGTGCGACCCATGTATACCAGGGGTCTCATTTCCTCCA  
 GATCACCATACGAGGCGCACTGTGAGTCTTGACAGGCATTGTAATTCCGGCTTGTTG  
 GTCCGCAACTGTACTATTACTGCGAATGCAGAGTGTGCTTGTAGAAACGGATGGCA  
 GTGCAGGGACAAAGAATGTACGGAGTGTGATCCACTGCCTAACCCAGTCTTACAG  
 CAAGATCTTCACAGGCCCTCAGCCCGCATCCTCAACCAACACATCTTCCTTACGTGT  
 CAGAAATGTTGGAGGCGCGAACCAGGAGCCATATGCAGACCCTGGCGGACTTTCGG  
 CAGCTGCCAGCACGCACACTTAGTACACACTGGCCACCACAACGCAGCTTGTGCTCT  
 TCCGATTTTCATCCGCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATA  
 GCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGC  
 TCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCACCCGCAAGC  
 ATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCACGCGTGAAGT  
 TCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC  
 GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCG  
 GGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTAC  
 AATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAG  
 GCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCC  
 ACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCA  
 GTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCC  
 CATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCT  
 GCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTG  
 CTTACAGCGCCGGACTGCCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACC  
 TGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACC  
 GAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGA

ACTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGA  
ACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGC  
GGCTGCAAAGAGTGCAGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGA  
GCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:31)

[0174] Соответствующая аминокислотная последовательность для **GSPco27Tr28tmdicCD3z15** представляет собой следующее:

[0175]MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTPALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
CSRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDC  
DQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQ  
CRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLP  
ARTLSTHWPPQRSLLCSSDFIRFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY  
MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR  
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG  
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMPRISKPHLR  
SISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA  
TLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESG  
CKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:54)

[0176]**CD27TrDAP10icd3z15**:

[0177]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCCTGGTGGGGCTCTCA  
GCTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCAGGGAAAGCT  
GTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCCTCGTGAAGGACTGTGACCAGCATA  
GAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTG CATACCGGGGGTCTCCTTCTCTCCTGACCACC  
ACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTCGGCACTGTA ACTCTGGTCTTCTCGTTGCA  
ACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTCGCAATGGCTGGCAGTGCAGGG  
ACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCAAACCCTTCGCTGACCGCTCGGTCTGT  
CTCAGGCCCTGAGCCCACACCCTCAGCCCACCCACTTACCTTATGTCAGTGAGATGC  
TGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAGGCAGCTGCCT  
GCCCCGACTCTCTTACCCACTGGCCACCCCAAAGATCCCTGTGCAGCTCCGATTTT  
ATTCGCATACTGGTCATCTTTTCTGGAATGTTCTTGTGTTACCCCTGGCAGGAGCCC  
TGTTCTTTCACCTTTGCGCACGCCCACGCCGAGCCCCGCCCAAGAAGATGGCAAAG  
TCTACATCAACATGCCAGGCAGGGGCAAACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAC  
GCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACG  
AAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGG

GGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAG  
 ATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGG  
 CAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG  
 ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTC  
 TCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAG  
 CCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCAC  
 TTCCTGACCGAGGCCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTG  
 CCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGG  
 ACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCAC  
 CCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTGATCAGC  
 CTGGAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGC  
 CAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGC  
 GAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGT  
 GCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:32)

[0178] Соответствующая аминокислотная последовательность для **CD27TrDAP10icd3z15** представляет собой следующее:

[0179]MTRVTNSPSLQAHLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTP TALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCD  
 QHRKAAQCDPCIPGVFSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCR  
 DKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPAR  
 TLSTHWPPQRS LCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHLCARPRRSPAQEDGKVYINMP  
 GRGKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRN  
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP  
 PRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILG  
 CFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQ  
 VISLESGDASIHD TVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMF  
 INTS (SEQ ID NO:55)

[0180]**GSPco27FLdap10icd3z15**:

[0181]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
 TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCTC  
 TGATCCCAGCTACACCGGCTCCGAAGTCCTGCCCGGAGCGGCATTATTGGGCACAG  
 GGCAAGTTGTGTTGTCAAATGTGTGAGCCGGGAACCTTTCTCGTGAAGGATTGCGAT  
 CAGCATCGGAAGGCCGCGCAGTGCGACCCATGTATAACAGGGGTCTCATTTTCCCCA  
 GATCACCATACGAGGCCGCACTGTGAGTCTTGCAGGCATTGTAATTCCGGCTTGTTG

GTCCGCAACTGTACTATTACTGCGAATGCAGAGTGTGCTTGTAGAAACGGATGGCA  
 GTGCAGGGACAAAGAATGTACGGAGTGTGATCCACTGCCTAACCCCAGTCTTACAG  
 CAAGATCTTCACAGGCCCTCAGCCCGCATCCTCAACCAACACATCTTCCTTACGTGT  
 CAGAAATGTTGGAGGCGCGAACCGCAGGCCATATGCAGACCCTGGCGGACTTTCGG  
 CAGCTGCCAGCACGCACACTTAGTACACACTGGCCACCACAACGCAGCTTGTGCTCT  
 TCCGATTTTCATCCGCATACTGGTCATCTTTTCTGGAATGTTCTTGTGTTACCCTGG  
 CAGGAGCCCTGTTCTTCACCTTTGCGCACGCCACGCCGCAGCCCCGCCCAAGAAG  
 ATGGCAAAGTCTACATCAACATGCCAGGCAGGGGCAAACGCGTGAAGTTCAGCAGG  
 AGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA  
 TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTG  
 AGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACT  
 GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGC  
 CGGAGGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA  
 CACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAA  
 TTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCAT  
 TAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAA  
 CAGCCACTTCCTGACCGAGGCCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGC  
 CGGACTGCCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGA  
 TCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGAC  
 GTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTG  
 ATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCAT  
 CCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAA  
 GAGTGCGAGGAACCTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCA  
 CATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:33)

[0182] Соответствующая аминокислотная последовательность для **GSPco27FLdap10icd3z15** представляет собой следующее:

[0183]MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTPALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMILLVTSLLLCELPHPAFLLIPATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDC  
 DQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQ  
 CRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLP  
 ARTLSTHWPPQRS LCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHLCARPRRSPAQEDGKVYIN  
 MPGRGKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRR  
 KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ  
 ALPPRG PQCTNYALLKLADVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFI  
 LGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLEL  
 QVISLES GDASIHDVTENLILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQM  
 FINTS (SEQ ID NO:56)

[0184]**CD27TrDAP12icd3z15**:

[0185]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC

TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCCTGGTGGGGCTCTCA  
 GCTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCAGGGAAAGCT  
 GTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCCTCGTGAAGGACTGTGACCAGCATA  
 GAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTGATACCGGGGGTCTCCTTCTCTCCTGACCACC  
 ACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTCGGCACTGTAACTCTGGTCTTCTCGTTCGCA  
 ACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTCGCAATGGCTGGCAGTGCAGGG  
 ACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCCAAACCCTTCGCTGACCGCTCGGTCTGT  
 CTCAGGCCCTGAGCCCACACCCTCAGCCCACCCACTTACCTTATGTCAGTGAGATGC  
 TGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAGGCAGCTGCCT  
 GCCCGGACTCTCTTACCCACTGGCCACCCCAAAGATCCCTGTGCAGCTCCGATTTT  
 ATTCGCATCCTTGTGATCTTCTCTGGAATGTTCTTGTTTTACCCTGGCCGGGGCCC  
 TGTTCTCCATTACTTCTTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGGCTGCGGAGG  
 CAGCGACCCGGAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAG  
 GGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAAAA  
 ACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACC  
 AGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAA  
 AGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGG  
 AAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATT  
 GGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTC  
 TCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTC  
 GCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCA  
 ATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCT  
 ACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCGGCATCCACGTGTTCA  
 TCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTG  
 ATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCAC  
 CCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCT  
 TTCTGCTGGAAGTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGAC  
 ACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGT  
 GACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAG  
 TTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID  
 NO:34)

[0186] Соответствующая аминокислотная последовательность для  
**CD27TrDAP12icd3z15** представляет собой следующее:

[0187] MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTP TALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP

CSRMARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCD  
 QHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCR  
 DKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPAR  
 TLSTHWPPQRSLSLSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHYFLGRLVPRGRGAAEAATRK  
 QRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYKKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN  
 LGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR  
 GKGDHGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKP  
 HLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMH  
 IDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVT  
 ESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:57)

[0188]**GSPco27FLdap12icd3z15:**

[0189]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
 TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
 ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCC  
 TGATCCCAGCTACACCGGCTCCGAAGTCCTGCCCGGAGCGGCATTATTGGGCACAG  
 GGCAAGTTGTGTTGTCAAATGTGTGAGCCGGGAACCTTTCTCGTGAAGGATTGCGAT  
 CAGCATCGGAAGGCCGCGCAGTGCGACCCATGTATAACCAGGGGTCTCATTTTCCCCA  
 GATCACCATACGAGGCCGCACTGTGAGTCTTGCAGGCATTGTAATTCCGGCTTGTTG  
 GTCCGCAACTGTACTATTACTGCGAATGCAGAGTGTGCTTGTAGAAACGGATGGCA  
 GTGCAGGGACAAAGAATGTACGGAGTGTGATCCACTGCCTAACCCAGTCTTACAG  
 CAAGATCTTCACAGGCCCTCAGCCCGCATCCTCAACCAACACATCTTCCTTACGTGT  
 CAGAAATGTTGGAGGCGCGAACCGCAGGCCATATGCAGACCCTGGCGGACTTTCGG  
 CAGCTGCCAGCACGCACACTTAGTACACACTGGCCACCACAACGCAGCTTGTGCTCT  
 TCCGATTTTCATCCGCATACTGGTCATCTTTTCTGGAATGTTCTTGTGTTACCCCTGG  
 CAGGAGCCCTGTTCTTCACTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGG  
 CTGCGGAGGCAGCGACCCGGAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAG  
 GAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTA  
 TTACAAAAAACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGG  
 GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT  
 TTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGA  
 ACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC  
 AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT  
 ACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC  
 CTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGAT  
 GTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAG  
 CATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCTTGACCGAGGCCGGCAT

CCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACTG  
GGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACA  
TCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACCGCC  
ATGAAGTGCTTTCTGCTGGAAGTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAG  
CATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCA  
ACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGAA  
CATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAG  
CTGA (SEQ ID NO:35)

[0190] Соответствующая аминокислотная последовательность для **GSPco27FLdap12icd3z15** представляет собой следующее:

[0191]MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTPALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
CSRMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDC  
DQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQ  
CRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLP  
ARTLSTHWPPQRS LCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHYFLGRLVPRGRGAAEAATR  
KQRITETESPYQELQGQRSDVYS DLNTQRPYYKKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL  
NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR  
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKL AGDVESNP GPMRISK  
PHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSM  
HIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLILANNLS SNGNV  
TESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TS (SEQ ID NO:58)

[0192]**CD27TrNKG2Dic3z15**:

[0193]ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCC  
ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG  
ATGGCACGGCCACATCCCTGGTGGCTGTGCGTTCTGGGGACCCTGGTGGGGCTCTCA  
GCTACTCCAGCCCCCAAGAGCTGCCCAGAGAGGCACTACTGGGCTCAGGGAAAGCT  
GTGCTGCCAGATGTGTGAGCCAGGAACATTCCTCGTGAAGGACTGTGACCAGCATA  
GAAAGGCTGCTCAGTGTGATCCTTG CATAACCGGGGGTCTCCTTCTCTCCTGACCACC  
ACACCCGGCCCCACTGTGAGAGCTGTCGGCACTGTA ACTCTGGTCTTCTCGTT CGCA  
ACTGCACCATCACTGCCAATGCTGAGTGTGCCTGTCGCAATGGCTGGCAGTGCAGGG  
ACAAGGAGTGCACCGAGTGTGATCCTCTTCAAACCCTTCGCTGACCGCTCGGTCTGT  
CTCAGGCCCTGAGCCCACACCCTCAGCCCACCCACTTACCTTATGT CAGTGAGATGC  
TGGAGGCCAGGACAGCTGGGCACATGCAGACTCTGGCTGACTTCAGGCAGCTGCCT  
GCCCCGACTCTCTTACCCACTGGCCACCCCAAAGATCCCTGTGCAGCTCCGATTTT  
ATTCGCATCCTTGTGATCTTCTCTGGAATGTTCTTGT TTTTCAACCCTGGCCGGGGCCC

TGTTCTCCATAGCGCGAACGAACGCTGCAAAAGCAAAGTGGTGCCGTGCCGCCAG  
 AAACAGTGGCGCACCAGCTTTGATAGCAAAAACTGGATCTGAACTATAACCATTTT  
 GAAAGCATGGAATGGAGCCATCGCAGCCGCCGCCGCCGATTTGGGGCATGAAACG  
 CGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGGCCAGAACCAGC  
 TCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGA  
 CGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAG  
 GCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGG  
 ATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAG  
 TACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGG  
 ACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCC  
 CGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCT  
 GTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCGGCATCCACGTGTTTCATCCT  
 GGGCTGCTTCAGCGCCGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCA  
 GCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTG  
 TACACCGAGAGCGACGTGCACCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCT  
 GCTGGAAGTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCG  
 TGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACC  
 GAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTC  
 TGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:36)

[0194] Соответствующая аминокислотная последовательность для **CD27TrNKG2Dic3z15** представляет собой следующее:

[0195] MTRVTNSPSLQAHLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTPTALKVDGIAAWIHAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCD  
 QHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLRNCTITANAECACRNGWQCR  
 DKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPAR  
 TLSTHWPPQRSLSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHSANERCKSKVVPQRQKQWRT  
 SFDSKKLDLNYNHFESMEWSHRSRRGRIWGMKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN  
 LGRREEYDVLDRKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR  
 GKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKP  
 HLRISIQCYLCLLNHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMH  
 IDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLIILANNSLSSNGNVT  
 ESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:59)

[0196] **GSPco27TrNKG2Dic3z15**:

[0197] ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTC  
 TCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAA  
 CTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGC  
 CGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCT  
 GACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCC  
 ACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGG



ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACACACCCAGCATTCTCTCC  
 TGATCCCAGCTACACCGGCTCCGAAGTCCTGCCCCGAGCGGCATTATTGGGCACAG  
 GGCAAGTTGTGTTGTCAAATGTGTGAGCCGGAACCTTTCTCGTGAAGGATTGCGAT  
 CAGCATCGGAAGGCCGCGCAGTGCGACCCATGTATACCAGGGGTCTCATTTCCTCCCA  
 GATCACCATACGAGGGCCGCACTGTGAGTCTTGCAAGGCATTGTAATTCCGGCTTGTTG  
 GTCCGCAACTGTACTATTACTGCGAATGCAGAGTGTGCTTGTAGAAACGGATGGCA  
 GTGCAGGGACAAAGAATGTACGGAGTGTGATCCACTGCCTAACCCAGTCTTACAG  
 CAAGATCTTCACAGGCCCTCAGCCCGCATCCTCAACCAACACATCTTCCTTACGTGT  
 CAGAAATGTTGGAGGGCGGAACCGCAGGCCATATGCAGACCCTGGCGGACTTTCGG  
 CAGCTGCCAGCACGCACACTTAGTACACACTGGCCACCACAACGCAGCTTGTGCTCT  
 TCCGATTTTCATCCGCATACTGGTCATCTTTTCTGGAATGTTCTTGTGTTACCCCTGG  
 CAGGAGCCCTGTTCTTCACAGCGCGAACGAACGCTGCAAAAAGCAAAGTGGTGCCG  
 TGCCGCCAGAAACAGTGGCGCACCAAGCTTTGATAGCAAAAAACTGGATCTGAACTA  
 TAACCATTTTGAAAGCATGGAATGGAGCCATCGCAGCCGCCGCGGCCGCATTTGGG  
 GCATGAAACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGC  
 CAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT  
 GGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC  
 CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG  
 TGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC  
 AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG  
 CCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTT  
 GAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCAT  
 CCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCGGCATCCA  
 CGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGT  
 GAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCG  
 ACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCACAGCTGCAAGGTGACCGCCATG  
 AAGTGCTTTCTGCTGGAAGTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCAT  
 CCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACG  
 GCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCAGAGGAACTGGAAGAGAAGAACAT  
 CAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTG  
 A (SEQ ID NO:37)

[0198] Соответствующая аминокислотная последовательность для **GSPco27TrNKG2Dcd3z15** представляет собой следующее:

[0199]MTRVTNSPSLQAHLLQALYL VQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGD  
 TVWVRRHQTKNLEPRWKGPYTVLLTTPALKVDGIAAWIHAAHVKAADPGGGPSSRLP  
 CSRMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDC  
 DQHRKAAQCPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQ  
 CRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLP  
 ARTLSTHWPPQRSCLSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHSANERCKSKVVPQRQKQW  
 RTSFDSKKLDLNYNHFESMEWSHRSRRGRIWGMKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE

LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER  
 RRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGQPCTNYALLKLAGDVESNPGPMRIS  
 KPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSGAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQS  
 MHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN  
 VTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:60)

[0200] Последовательность открытой рамки считывания, кодирующая химерный рецептор, может быть получена из источника геномной ДНК, источника кДНК, или может быть синтезирована (например, с использованием ПЦР), или их комбинации. В зависимости от размера геномной ДНК и числа интронов может оказаться желательным использовать кДНК или ее комбинацию, поскольку было обнаружено, что интроны стабилизируют мРНК. Кроме того, также может быть преимущественным использовать эндогенные или экзогенные некодирующие области для стабилизации мРНК.

[0201] Полагается, что химерная конструкция может быть введена в иммунные клетки любого типа в виде «голой» ДНК или в подходящем векторе. Способы стабильной трансфекции клеток электропорацией с использованием «голой» ДНК известны в данной области. См., например, патент США № 6410319. «Голая» ДНК обычно относится к ДНК, кодирующей химерный рецептор, находящийся в плазмидном экспрессионном векторе, в надлежащей ориентации для экспрессии.

[0202] Альтернативно, для введения химерной конструкции в иммунные клетки можно использовать вирусный вектор (например, ретровирусный вектор, аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса или лентивирусный вектор). Подходящие векторы для применения в соответствии со способом по настоящему изобретению не являются реплицирующими в иммунных клетках. Известно большое количество векторов на основе вирусов, где число копий вируса, поддерживаемого в клетке, достаточно низкое для поддержания жизнеспособности клетки, например, такие как векторы на основе ВИЧ, SV40, EBV, HSV или BPV. Невирусные векторы включают плазмиды, транспозоны, наночастицы, липосомы, липиды, металлы или их комбинацию.

## **II. Цитокины**

[0203] В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие анти-CD70 CAR, сконструированы для экспрессии одного или более гетерологичных цитокинов и/или сконструированы для положительной регуляции нормальной экспрессии одного или более гетерологичных цитокинов. Клетки могут быть трансдуцированы или трансфектированы относительно одного или более цитокинов на том же векторе, как и другие гены.

[0204] Один или более цитокинов могут коэкспрессироваться из вектора в виде отдельного полипептида от антигенного рецептора. Интерлейкин-15 (IL-15), например, имеет ограниченное содержание в тканях, и только при патологических состояниях он наблюдается на определенном уровне в сыворотке или системно. IL-15 обладает несколькими свойствами, которые желательны для адоптивной терапии. IL-15 представляет собой гомеостатический цитокин, который индуцирует развитие и клеточную пролиферацию естественных клеток-киллеров, способствует эрадикации образовавшихся

опухолей за счет облегчения функционального подавления резидентных в опухоли клеток и ингибирует активационно-индуцированную клеточную гибель (AICD). В дополнение к IL-15 предусмотрены другие цитокины. Они включают, не ограничиваясь этим, цитокины, хемокины и другие молекулы, которые способствуют активации и пролиферации клеток, используемых для применения у человека. NK-клетки, экспрессирующие IL-15, способны к продолжающейся поддерживающей передаче сигналов цитокинов, что полезно для их выживаемости после инфузии.

[0205] В конкретных вариантах осуществления клетки экспрессируют один или более экзогенно введенных цитокинов. В качестве одного примера цитокин представляет собой IL-15, IL-12, IL-2, IL-18, IL-21, GM-CSF или их комбинацию. В качестве другого примера цитокин представляет собой IL-21. В качестве еще одного примера цитокин представляет собой IL-12. Цитокин может быть введен в NK-клетки экзогенно, поскольку он экспрессируется из экспрессионного вектора внутри клетки. В альтернативном случае эндогенный цитокин в клетке активируется при манипулировании с регуляцией экспрессии эндогенного цитокина, такой как генетическая рекомбинация в промоторном(ых) сайте(ах) цитокина. В случаях, когда цитокин обеспечивается в экспрессионной конструкции в клетку, то цитокин может кодироваться из того же вектора, что и «суицидный ген», и/или как анти-CD70 CAR. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к совместному использованию CAR с IL-15. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к совместному применению CAR с IL-21. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к совместному применению CAR с IL-12.

### **III. «Суицидные гены»**

[0206] В конкретных вариантах осуществления «суицидный ген» используется в сочетании с анти-CD70 клеточной терапией для контроля его применения и обеспечения возможности прекращения клеточной терапии в желаемое событие и/или время. «Суицидный ген» используется в трансдуцированных клетках с целью индукции гибели трансдуцированных клеток, когда это необходимо. Клетки по настоящему изобретению, которые были модифицированы для размещения вектора, описанного здесь, могут содержать один или более «суицидных генов». В некоторых вариантах осуществления термин «суицидный ген», используемый в данном документе, определяется как ген, который при введении пролекарства или другого агента вызывает переход генного продукта в соединение, которое вызывает гибель его клетки-хозяина. В других вариантах осуществления «суицидный ген» кодирует продукт гена, который при желании подвергается действию агента (такого как антитело), который нацеливается на продукт «суицидного гена».

[0207] В некоторых случаях клеточная терапия может быть связана с использованием одного или более «суицидных генов» любого типа, когда у субъекта, получающего клеточную терапию и/или получившего клеточную терапию, проявляются один или более симптомов одного или более нежелательных явлений, таких как синдром

высвобождения цитокинов, нейротоксичность, анафилаксия/аллергия и/или токсичность для опухоли/вне опухоли (в качестве примеров), или полагается, что субъект подвержен риску наличия одного или более симптомов, в том числе в ближайшем будущем. Использование «суицидного гена» может быть частью запланированного протокола терапии или может использоваться только в случае ставшей известной необходимости в его использовании. В некоторых случаях клеточную терапию прекращают с использованием агента(ов), нацеленного(ых) на «суицидальный ген» или продукт гена, поскольку проведение терапии больше не требуется.

[0208] Использование «суицидного гена» может быть вызвано при появлении, по меньшей мере, одного нежелательного явления у субъекта, и это нежелательное явление может быть выявлено любыми способами, включая рутинный мониторинг, который может быть или может не быть непрерывным с начала проведения клеточной терапии. Побочное явление(я) может быть обнаружено при обследовании и/или тестировании. В случаях, когда у субъекта наблюдается синдром высвобождения цитокинов (который также может называться цитокиновым штормом), у субъекта может иметь место повышенный уровень воспалительных цитокинов (просто в качестве примеров: гамма-интерферон, колониестимулирующий гранулоцитарно-макрофагальный фактор, IL-10, IL-6 и TNF-альфа); высокая температура; утомляемость; гипотония; гипоксия, тахикардия; тошнота; синдром капиллярной утечки; сердечная/почечная/печеночная дисфункция; или их комбинация, например. В случаях, когда у субъекта наблюдается нейротоксичность, то у него могут быть спутанность сознания, делирий, аплазия и/или судороги. В некоторых случаях субъекта проверяют на наличие маркера, ассоциированного с началом и/или тяжестью синдрома высвобождения цитокинов, такого как С-реактивный белок, IL-6, TNF-альфа и/или ферритин.

[0209] Примеры «суицидных генов» включают сконструированные несекретируемые (включая связанные с мембраной) мутантные полипептиды фактора некроза опухоли (TNF)-альфа (см. PCT/US19/62009, которая в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки), и на них может влиять доставка антитела, которое связывается с мутантным TNF-альфа. Примерами комбинаций «суицидного гена»/пролекарства, которые можно использовать, являются тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSV-tk) и ганцикловир, ацикловир или FIAU; оксидоредуктаза и циклогексимид; цитозиндезаминаза и 5-фторцитозин; тимидинкиназа-тимидилаткиназа (Tdk::Tmk) и AZT; и дезоксицитидинкиназа и цитозинарабинозид. Можно использовать пуриннуклеозидфосфорилазу *E.coli*, так называемый «суицидальный ген», который превращает пролекарство 6-метилпуриндезоксирибозид в токсичный пурин-6-метилпурин. Другие «суицидальные гены» включают CD20, CD52, индуцируемую каспазу 9, пуриннуклеозидфосфорилазу (PNP), ферменты цитохрома p450 (CYP), карбоксипептидазы (CP), карбоксиэстеразу (CE), нитроредуктазу (NTR), гуанинрибозилтрансферазу (XGRTP), ферменты гликозидазы, например, метионин- $\alpha$ , $\gamma$ -лиаза (MET) и тимидинфосфорилаза (TP).

[0210] В конкретных вариантах осуществления векторы, которые кодируют CAR,

нацеленный на CD70, или любой вектор в NK-клетке, описанной в настоящем документе, включают один или более «суицидных генов». «Суицидный ген» может находиться или может не находиться в том же векторе, что и CAR, нацеленный на CD70. В случаях, когда «суицидный ген» находится в том же векторе, что и CAR, нацеленный на CD70, то «суицидный ген» и CAR могут быть разделены, например, элементом IRES или 2A.

#### **IV. Фармацевтические композиции**

[0211] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат эффективное количество клеток, экспрессирующих анти-CD70 CAR, растворенных или диспергированных в фармацевтически приемлемом носителе. Выражение «фармацевтически или фармакологически приемлемые» относится к молекулярным объектам и композициям, которые не вызывают побочных, аллергических или других неблагоприятных реакций при введении животным, например, таким как, человек в зависимости от обстоятельств. Получение фармацевтической композиции, которая содержит клетки, экспрессирующие анти-CD70 CAR, будет понятно специалистам в данной области в свете настоящего описания, как показано в справочнике Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2005, включенном здесь посредством ссылки. Более того, для введения животным (например, человеку) следует понимать, что препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, согласно требованиям Департамент биологических стандартов FDA.

[0212] В рамках настоящего изобретения, термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые без исключения растворители, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные средства, противогрибковые средства), изотонические средства, вещества, замедляющие абсорбцию, соли, консерванты, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, гели, связующие вещества, эксципиенты, дезинтегрирующие агенты, смазывающие вещества, подсластители, ароматизаторы, красители, подобные материалы и их комбинации, которые известны специалистам в данной области (см., например, справочник Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, включенный здесь посредством ссылки). За исключением случаев, когда любой обычный носитель несовместим с активным ингредиентом, то предполагается его использование в фармацевтических композициях.

[0213] Фармацевтические композиции могут содержать различные типы носителей в зависимости от того, следует их вводить в твердой, жидкой или аэрозольной форме, и от того, должны они быть стерильными для таких способов введения, как инъекция. Раскрытые в настоящем документе композиции можно вводить внутривенно, внутрикожно, чрескожно, интратекально, внутриартериально, внутрибрюшинно, интраназально, интравагинально, интаректально, местно, внутримышечно, подкожно, мукозально, перорально, наружно, местно, путем ингаляции (например, аэрозольной ингаляции), инъекции, инфузии, непрерывной инфузии, локальной перфузии, непосредственно

омывающей клетки-мишени, через катетер, через лаваж, в кремах, в липидных композициях (например, в липосомах) или другим способом или любой комбинацией вышеописанного, как известно специалистам с обычной квалификацией в данной области техники (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, включенный здесь посредством ссылки).

[0214] Клетки, экспрессирующие анти-CD70 CAR, могут быть включены в композицию в виде свободного основания, нейтральной формы или соли. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотнo-аддитивные соли, например, соли, образованные свободными аминoгруппами белков композиции, или соли, которые образованные неорганическими кислотами, например, такими как соляная или фосфорная кислоты, или органическими кислотами, такими как уксусная, щавелевая, винная или миндальная кислота. Соли, образованные свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, например, таких как гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа; или органических оснований, таких как изопропиламин, триметиламин, гистидин или прокаин. После формуляции растворы должны вводиться способом, совместимым с лекарственным составом, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводятся в различных лекарственных формах, таких как составы для парентерального введения, такие как растворы для инъекций, или аэрозоли для доставки в легкие, или составы для алиментарного введения, такие как капсулы с высвобождением лекарственного средства и т.п.

[0215] Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением композиции по настоящему изобретению, подходящие для введения, обеспечиваются в фармацевтически приемлемом носителе с инертным разбавителем или без него. Носитель должен быть усваиваемым, и включает жидкие, полутвердые, т. е. пасты, или твердые носители. За исключением случаев, когда любая обычная среда, агент, разбавитель или носитель являются токсичными для реципиента или для достижения терапевтической эффективности, содержащейся в них композиции, целесообразно их использование в составе вводимой композиции для применения на практике способов по настоящему изобретению. Примеры носителей или разбавителей включают жиры, масла, воду, солевые растворы, липиды, липосомы, смолы, связующие вещества, наполнители и т.п., или их комбинации. Композиция может также содержать различные антиоксиданты для замедления окисления одного или более компонентов. Кроме того, предупреждение действия микроорганизмов может быть обеспечено консервантами, такими как различные антибактериальные и противогрибковые агенты, включая, помимо прочего, парабены (например, метилпарабены, пропилпарабены), хлорбутанол, фенол, сорбиновую кислоту, тимеросал или их комбинации.

[0216] В соответствии с настоящим изобретением композицию объединяют с носителем любым удобным и практичным способом, т. е. растворением, суспендированием, эмульгированием, смешиванием, инкапсулированием, абсорбцией и т.п. Такие процедуры являются обычными для специалистов в данной области.

[0217] В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения композицию объединяют или тщательно смешивают с полутвердым или твердым носителем. Смешивание можно осуществить любым удобным способом, таким как растирание. Стабилизирующие агенты также можно добавить в процессе смешивания для защиты композиции от потери терапевтической активности, т.е. расщепления в желудке. Примеры стабилизаторов для использования в композиции включают буферы, аминокислоты, такие как глицин и лизин, углеводы, такие как декстроза, манноза, галактоза, фруктоза, лактоза, сахароза, мальтоза, сорбит, маннит и т.д.

[0218] В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению композиций фармацевтического липидного носителя, которые включают клетки, экспрессирующие анти-CD70 CAR, и необязательно водный растворитель. Используемый здесь термин «липид» определяется как включающий любое из широкого ряда веществ, которые характерно являются нерастворимыми в воде и экстрагируются органическим растворителем. Данный широкий класс соединений хорошо известен специалистам в данной области, и поскольку здесь используется термин «липид», то он не ограничивается какой-либо конкретной структурой. Примеры включают соединения, которые содержат алифатические углеводороды с длинной цепью и их производные. Липид может быть природным или синтетическим соединением (т. е., созданным или полученным человеком). Однако липид обычно является биологическим веществом. Биологические липиды хорошо известны в данной области и включают, например, нейтральные жиры, фосфолипиды, фосфоглицериды, стероиды, терпены, лизолипиды, гликофинголипиды, гликолипиды, сульфатиды, липиды с простыми и сложными эфирами жирных кислот, и полимеризуемые липиды и их комбинации. Конечно, соединения, отличные от конкретно описанных здесь, которые специалист в данной области понимает как липиды, также охватываются композициями и способами по настоящему изобретению.

[0219] Специалистам с обычной квалификацией в данной области должен быть известен ряд методов, которые можно использовать для диспергирования композиции в липидном носителе. Например, клетки, экспрессирующие анти-CD70 CAR, которые можно диспергировать в растворе, содержащем липид, растворить в липиде, эмульгировать липидом, смешать с липидом, объединить с липидом, ковалентно связать с липидом, находятся в виде суспензии в липиде, содержатся в или находятся в комплексе с мицеллой или липосомой, или иным образом связаны с липидом или липидной структурой любыми способами, известными специалистам в данной области. Дисперсия может приводить или не приводить к образованию липосом.

[0220] Фактический уровень доз композиции по настоящему изобретению, вводимой пациенту-животному, может определяться физическими и физиологическими факторами, такими как масса тела, тяжесть патологического состояния, тип заболевания, которое лечат, предшествующие или одновременные терапевтические вмешательства, идиопатия у пациента и путь введения. В зависимости от дозировки и пути введения

количество введений предпочтительной дозы и/или эффективного количества может варьироваться в зависимости от ответной реакции субъекта. Практикующий врач, ответственный за введение, в любом случае будет определять концентрацию активного ингредиента(ов) в композиции и соответствующую дозу(ы) для каждого отдельного субъекта.

[0221] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут содержать, например, по меньшей мере, примерно 0,1% активного соединения. В других вариантах осуществления активное соединение может составлять примерно от 2% до примерно 75% весовой единицы или, например, примерно от 25% до примерно 60%, и в любом диапазоне, производном из этого. Естественно, количество активного соединения(ий) в каждой терапевтически пригодной композиции должно быть обеспечено таким образом, чтобы была получена подходящая дозировка для любой заданной разовой дозы соединения. Такие факторы, как растворимость, биодоступность, биологический период полураспада, способ введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические факторы должны учитываться специалистом в области формуляции таких фармацевтических составов, и при этом могут быть желательными различные дозировки и схемы лечения.

[0222] В других неограничивающих примерах доза может также составлять примерно 1 мкг/кг/массы тела, примерно 5 мкг/кг/массы тела, примерно 10 мкг/кг/массы тела, примерно 50 мкг/кг/массы тела, примерно 100 мкг/кг/массы тела, примерно 200 мкг/кг/массы тела, примерно 350 мкг/кг/масса тела, примерно 500 мкг/кг/массы тела, примерно 1 мг/кг/массы тела, примерно 5 мг /кг/массы тела, примерно 10 мг/кг/массы тела, примерно 50 мг/кг/массы тела, примерно 100 мг/кг/массы тела, примерно 200 мг/кг/массы тела, примерно 350 мг/кг/массы тела, примерно от 500 мг/кг/массы тела до примерно 1000 мг/кг/массы тела или более на одно введение, и любой диапазон, полученный в этих пределах. В неограничивающих примерах диапазона, полученного из приведенных здесь числовых значений, можно использовать диапазон примерно от 5 мг/кг/массы тела до примерно 100 мг/кг/масса тела, примерно от 5 мг/кг/массы тела до примерно 500 мг/кг/массы тела и т.д., на основе числовых значений, приведенных выше.

#### **А. Композиции и составы для алиментарного введения**

[0223] В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, экспрессирующие анти-CD70 CAR, формулированы для введения алиментарным путем. Алиментарные пути включают все возможные пути введения, при которых композиция находится в непосредственном контакте с пищеварительным трактом. В частности, фармацевтические композиции, описанные здесь, можно вводить перорально, трансбуккально, ректально или сублингвально. При этом, такие композиции могут быть формулированы с инертным разбавителем или с усваиваемым съедобным носителем, или они могут быть заключены в желатиновые капсулы с твердой или мягкой оболочкой, или они могут быть спрессованы в таблетки, или они могут быть включены непосредственно в состав продукта рациона.



[0224] В некоторых вариантах осуществления активные соединения можно объединить с эксципиентами и использовать в форме таблеток для приема внутрь, трансбуккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, вафель и т.п. (Mathiowitz et al., 1997; Hwang et al., 1998; патенты США № 5641515, 5580579 и 5792451, каждый из которых в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки). Таблетки, пастилки, пилюли, капсулы и т.п. могут также содержать следующие компоненты: связующее вещество, например, такое как трагакантовая камедь, аравийская камедь, кукурузный крахмал, желатин или их комбинации; эксципиент, например, такой как дикальцийфосфат, маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния или их комбинации; разрыхлитель, например, такой как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота или их комбинации; лубрикант, например, такой как стеарат магния; подсластитель, например, такой как сахароза, лактоза, сахарин или их комбинации; ароматизатор, например, такой как перечная мята, винтергриновое масло, вишневый ароматизатор, апельсиновый ароматизатор и т. д. Когда разовая лекарственная форма представляет собой капсулу, то она может содержать, кроме веществ вышеуказанного типа, жидкий носитель. Различные другие вещества могут находиться в качестве покрытий или иным образом модифицировать физическую форму разовой лекарственной формы. Например, таблетки, пилюли или капсулы могут быть покрыты шеллаком, сахаром или и тем, и другим. Когда лекарственная форма представляет собой капсулу, то она может содержать помимо веществ вышеуказанного типа носители, такие как жидкий носитель. Желатиновые капсулы, таблетки или пилюли могут быть покрыты кишечнорастворимой оболочкой. Кишечнорастворимые покрытия предотвращают денатурацию композиции в желудке или верхних отделах кишечника, где pH является кислым. См., например, патент США № 5629001. При достижении тонкого кишечника его основное значение pH способствует растворению покрытия и позволяет композиции высвободиться и абсорбироваться специализированными клетками, например, эпителиальными энтероцитами и М-клетками пейеровых бляшек. Сироп эликсира может содержать активное соединение сахарозу в качестве метилового подсластителя и пропилпарабены в качестве консервантов, краситель и ароматизатор, такой как вишневый или апельсиновый ароматизатор. Конечно, любое вещество, используемое при приготовлении любой разовой лекарственной формы, должно быть фармацевтически чистым и по существу нетоксичным в используемых количествах. Кроме того, активные соединения могут быть включены в препараты и составы с замедленным высвобождением.

[0225] Для перорального введения композиции по настоящему изобретению альтернативно могут быть включены с одним или более эксципиентами в форме жидкости для полоскания ротовой полости, зубной пасты, буккальной таблетки, перорального спрея или сублингвального состава для перорального введения. Например, можно приготовить жидкость для полоскания ротовой полости, включающую активный ингредиент в необходимом количестве в соответствующем растворителе, таком как раствор бората натрия (раствор Добелла). В качестве альтернативы активный ингредиент может быть

включен в раствор для перорального применения, такой как раствор, содержащий борат натрия, глицерин и бикарбонат калия, или диспергирован в средстве для ухода за зубами, или добавлен в терапевтически эффективном количестве к композиции, которая может включать воду, связующие вещества, абразивы, ароматизаторы, пенообразователи и увлажнители. В качестве альтернативы композиции могут быть представлены в виде таблеток или растворов, которые можно поместить под язык или иным образом растворить во рту.

[0226] Дополнительные составы, подходящие для других способов алиментарного введения, включают суппозитории. Суппозитории представляют собой твердые лекарственные формы различной массы и формы, обычно содержащие лекарственное средство, для введения в прямую кишку. После введения суппозитории размягчаются, плавятся или растворяются в полостных жидкостях. Как правило, для суппозитория традиционные носители могут включать, например, полиалкиленгликоли, триглицериды или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления суппозитории могут быть изготовлены из смесей, содержащих, например, активный ингредиент в диапазоне примерно от 0,5% до примерно 10% и предпочтительно примерно от 1% до примерно 2%.

#### **В. Композиции и составы для парентерального введения**

[0227] В дополнительных вариантах осуществления композиции можно вводить парентеральным путем. Используемый здесь термин «парентеральный» включает пути введения в обход пищеварительного тракта. В частности, фармацевтические композиции, описанные здесь, можно вводить, например, без ограничения, внутривенно, внутрикожно, внутримышечно, внутриартериально, интратекально, подкожно или внутрибрюшинно, патенты США № 6613308; 5466468; 5543158; 5641515 и 5399363 (каждый из которых в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки).

[0228] Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей могут быть приготовлены в воде, соответствующим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также можно приготовить в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и также в маслах. При обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предупреждения роста микроорганизмов. Фармацевтические формы, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий экстемперо для инъекций (патент США № 5466468, специально включенный здесь в полном объеме посредством ссылки). Во всех случаях форма должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить инъекционно. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (т.е. глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и/или растительные масла. Надлежащую

текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае диспергирования и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предупредить действие микроорганизмов можно с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, например, сахара или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть обеспечено за счет использования в композициях агентов, замедляющих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0229] Для парентерального введения, например, в водном растворе, раствор следует соответствующим образом забуферить, если это необходимо, и жидкий разбавитель сначала сделать изотоническим с помощью достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Такие конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В этой связи стерильные водные среды, которые можно использовать, будут известны специалистам в данной области техники в свете настоящего изобретения. Например, одну дозу можно растворить в изотоническом растворе NaCl, и либо добавить жидкость для гиподермоклизиса, либо ввести инъекционно в предполагаемое место инфузии (см., например, «Remington's Pharmaceutical Sciences», 15<sup>th</sup> Edition, pages 1035-1038 и 1570-1580). Некоторое изменение дозировки обязательно будет иметь место в зависимости от состояния субъекта, которого лечат. Лицо, ответственное за введение, в любом случае определит соответствующую дозу для каждого отдельного субъекта. Более того, для введения человеку препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты согласно требованиям Департамента биологических стандартов FDA.

[0230] Стерильные растворы для инъекций готовят включением активных соединений в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят включением различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами приготовления являются методы вакуумной сушки и лиофилизации, которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора. Порошкообразную композицию объединяют с жидким носителем, например, таким как вода или физиологический раствор, со стабилизатором или без него.

### **С. Различные фармацевтические композиции и составы**

[0231] В других конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения

клетки активного соединения, экспрессирующие анти-CD70 CAR, могут быть сформулированы для введения различными путями, например, местного (т. е. трансдермального) введения, мукозального введения (интраназального, интравагинального и т.п.) и/или ингаляционно.

[0232] Фармацевтические композиции для местного применения могут включать активное соединение, сформулированное для медицинского применения, такое как мазь, паста, крем или порошок. Мази включают все композиции на масляной, адсорбционной, эмульсионной и водорастворимой основе для местного применения, и к кремам и лосьонам относятся такие композиции, которые включают только эмульсионную основу. Лекарственные средства для местного применения могут содержать усилитель проникновения для облегчения адсорбции активных ингредиентов через кожу. Подходящие усилители проникновения включают глицерин, спирты, алкилметилсульфоксиды, пирролидоны и луарокапрам. Возможные основы для композиций для местного применения включают полиэтиленгликоль, ланолин, кольдкрем и вазелин, а также любые другие подходящие абсорбирующие, эмульсионные или водорастворимые мазевые основы. Препараты для местного применения могут также включать эмульгаторы, желирующие агенты и противомикробные консерванты, если это необходимо для сохранения активного ингредиента и обеспечения однородной смеси. Трансдермальное введение по настоящему изобретению может также включать использование «пластыря». Например, пластырь может доставлять одно или более активных веществ с заданной скоростью и непрерывным образом в течение фиксированного периода времени.

[0233] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут доставляться с использованием глазных капель, интраназальных спреев, ингаляций и/или других аэрозольных средств доставки. Способы доставки композиций непосредственно в легкие с помощью назальных аэрозольных спреев описаны, например, в патентах США № 5756353 и 5804212 (каждый из которых в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки). Аналогичным образом, также хорошо известна в области фармацевтики доставка лекарственных средств с использованием интраназальных смол в виде микрочастиц (Takenaga et al., 1998) и лизофосфатидилглицериновых соединений (патент США № 5725871, специально включенный здесь в полном объеме посредством ссылки). Аналогичным образом, трансмукозальная доставка лекарственного средства в форме матрицы-подложки из политетрафторэтилена описана в патенте США № 5780045 (специально включенном здесь в полном объеме посредством ссылки).

[0234] Термин «аэрозоль» относится к коллоидной системе из тонкоизмельченных твердых и жидких частиц, диспергированных в сжиженном или сжатом газе-пропелленте. Типичный аэрозоль по настоящему изобретению для ингаляции будет состоять из суспензии активных ингредиентов в жидком пропелленте или смеси жидкого пропеллента и подходящего растворителя. Подходящие пропелленты включают углеводороды и простые эфиры углеводородов. Подходящие контейнеры будут варьироваться в

зависимости от требований к давлению топлива. Введение аэрозоля будет варьироваться в зависимости от возраста, массы тела субъекта, тяжести и ответной реакции симптомов.

#### **V. Комбинированная терапия**

[0235] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы в соответствии с настоящими вариантами осуществления включают терапию рака, которая является дополнительной к композициям, содержащим клетки, экспрессирующие анти-CD70 CAR. Дополнительной терапией может быть лучевая терапия, хирургическое вмешательство (например, лампэктомия и мастэктомия), химиотерапия, генная терапия, ДНК-терапия, вирусная терапия, РНК-терапия, иммунотерапия, трансплантация костного мозга, нанотерапия, терапия моноклональными антителами, гормональная терапия или их комбинация вышеизложенного. Дополнительная терапия может быть в форме адъювантной или неоадъювантной терапии.

[0236] В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой введение низкомолекулярных ингибиторов ферментов или антиметастатических агентов. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой введение средств, ограничивающих побочные эффекты (например, средств, предназначенных для снижения возникновения и/или тяжести побочных эффектов лечения, таких как средства против тошноты и т. д.). В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой лучевую терапию. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой хирургическое вмешательство. В некоторых вариантах дополнительная терапия представляет собой комбинацию лучевой терапии и хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой облучение гамма-лучами. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой терапию, направленную на путь RBK/АКТ/mTOR, ингибитор HSP90, ингибитор тубулина, ингибитор апоптоза и/или химиопрофилактическое средство(а). Дополнительная терапия может представлять собой один или более химиотерапевтических агентов, известных в данной области.

[0237] Терапию иммунными клетками (в дополнение к клеточной терапии по настоящему изобретению) можно проводить до, во время, после или в различных комбинациях относительно дополнительной терапии рака, такой как терапия на основе контрольных иммунных точек. Введение может осуществляться с интервалами от одновременного введения до нескольких минут, суток и недель. В вариантах осуществления, в которых иммунная клеточная терапия предоставляется пациенту отдельно от композиции(й) по настоящему изобретению, то обычно следует гарантировать, что между временем каждой доставки не истекает значительный период времени, так что два соединения все еще будут функционировать для обеспечения возможности оказывать преимущественное комбинированное воздействие на пациента. В таких случаях полагается, что можно обеспечить пациента иммунотерапевтической терапией и раскрытыми композициями в пределах от 12 до 24 или 72 ч друг от друга и, более конкретно, в течение

примерно 6-12 ч друг от друга. В некоторых ситуациях может оказаться желательным значительно увеличить период лечения с перерывом от нескольких суток (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8) между соответствующими введениями.

[0238] Введение пациенту любого соединения или клеточной терапии в соответствии с настоящими вариантами осуществления должно проводиться, следуя общим протоколам введения таких соединений с учетом токсичности агентов, если таковая имеется. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления предусматривается стадия мониторинга токсичности, связанной с комбинированной терапией.

[0239] Термин «рак», используемый в данном документе, может использоваться для описания солидной опухоли, метастатического рака или неметастатического рака. В некоторых вариантах осуществления рак может развиваться в мочевом пузыре, крови, костях, костном мозге, головном мозге, молочной железе, толстой кишке, пищеводе, двенадцатиперстной кишке, тонкой кишке, толстой кишке, толстой кишке, прямой кишке, анусе, десне, голове, почках, печени, легких, носоглотке, шее, яичнике, поджелудочной железе, предстательной железе, коже, желудке, яичке, языке или матке. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рецидивирующий рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак I стадии. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак стадии II. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак стадии III. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак стадии IV.

[0240] Рак может конкретно включать следующий гистологический тип, хотя он не ограничивается этим: злокачественное новообразование; карциному; недифференцированную карциному; гигантскую и веретенноклеточную карциному; мелкоклеточную карциному; папиллярную карциному; плоскоклеточную карциному; лимфоэпителиальную карциному; базально-клеточную карциному; пиломатрическую карциному; переходно-клеточную карциному; папиллярную переходно-клеточную карциному; аденокарциному; злокачественную гастриному; холангиокарциному; гепатоцеллюлярную карциному; комбинированную гепатоцеллюлярную карциному и холангиокарциному; трабекулярную аденокарциному; аденоидно-кистозную карциному; аденокарциному в аденоматозном полипе; аденокарциному, семейный полипоз толстого кишечника; солидную карциному; злокачественную карциноидную опухоль; бронхиолоальвеолярную аденокарциному; папиллярную аденокарциному; хромофобную карциному; ацидофильную карциному; оксифильную аденокарциному; базофильную карциному; светлоклеточную аденокарциному; зернистоклеточную карциному; фолликулярную аденокарциному; папиллярную и фолликулярную аденокарциному; неинкапсулированную склерозирующую карциному; карциному коры надпочечника; эндометроидную карциному; карциному придатков кожи; апокринную аденокарциному; аденокарциному сальных желез; церуминозную аденокарциному; мукоэпидермоидную карциному; цистаденокарциному; папиллярную цистаденокарциному; папиллярную серозную цистаденокарциному; муцинозную цистаденокарциному; муцинозную

аденокарциному; перстневидноклеточную карциному; инфильтрирующую протоковую карциному; медуллярную карциному; дольковую карциному; воспалительную карциному; болезнь Педжета, молочная железа; ацинарноклеточную карциному; аденосквамозную карциному; аденокарциному с плоскоклеточной метаплазией; злокачественную тимому; злокачественную опухоль стромы яичника; злокачественную текому; злокачественную гранулезоклеточную опухоль; злокачественную андробластому; карциному из клеток Сертоли; злокачественную опухоль из клеток Лейдига; злокачественную опухоль из липидных клеток; злокачественную параганглиому; злокачественную экстрамаммарную параганглиому; феохромоцитому; гломангиосаркому; злокачественную меланому; амеланотическую меланому; поверхностно-распространяющуюся меланому; злокачественную меланому в гигантском пигментном невусе; эпителиоидноклеточную меланому; злокачественный голубой невус; саркому; фибросаркому; злокачественную фиброзную гистиоцитому; миксосаркому; липосаркому; лейомиосаркому; рабдомиосаркому; эмбриональную рабдомиосаркому; альвеолярную рабдомиосаркому; стромальную саркому; злокачественную смешанную опухоль; злокачественную смешанную опухоль Мюллера; нефробластому; гепатобластому; карциносаркому; злокачественную мезенхимому; злокачественную опухоль Бреннера; злокачественную филлоидную опухоль; синовиальную саркому; злокачественную мезотелиому; дисгерминому; эмбриональную карциному; злокачественную тератому; злокачественную опухоль стромы яичника; хориокарциному; злокачественную мезонефрону; гемангиосаркому; злокачественную гемангиоэндотелиому; саркому Капоши; злокачественную гемангиоперицитому; лимфангиосаркому; остеосаркому; юкстакортикальную остеосаркому; хондросаркому; злокачественную хондробластому; мезенхимальную хондросаркому; гигантоклеточную опухоль кости; саркому Юинга; злокачественную одонтогенную опухоль; амелобластическую одонтосаркому; злокачественную амелобластому; амелобластическую фибросаркому; злокачественную пинеалому; хордому; злокачественную глиому; эпендимому; астроцитому; протоплазматическую астроцитому; фибриллярную астроцитому; астробластому; глиобластому; олигодендроглиому; олигодендробластому; примитивную нейроэктодермальную опухоль; саркому мозжечка; ганглионейробластому; нейробластому; ретинобластому; ольфакторную нейрогенную опухоль; злокачественную менингиому; нейрофибросаркому; злокачественную неврилеммому; злокачественную зернистоклеточную опухоль; злокачественную лимфому; болезнь Ходжкина; парагранулему; злокачественную малую лимфоцитарную лимфому; злокачественную крупноклеточную диффузную лимфому; злокачественную фолликулярную лимфому; грибовидный микоз; другие уточненные неходжкинские лимфомы; злокачественный гистиоцитоз; множественную миелому; тучноклеточную саркому; иммунопролиферативное заболевание тонкого кишечника; лейкоз; лимфолейкоз; плазмноклеточный лейкоз; эритролейкоз; лимфосаркомноклеточный лейкоз; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз;

тучноклеточный лейкоз; мегакариобластный лейкоз; миелоидную саркому; и волосатоклеточный лейкоз.

### **А. Химиотерапия**

[0241] В соответствии с настоящими вариантами осуществления можно использовать широкий ряд химиотерапевтических препаратов. Термин «химиотерапия» относится к использованию лекарственных препаратов для лечения рака. «Химиотерапевтическое средство» используется для обозначения соединения или композиции, которые вводят при лечении рака. Данные агенты или лекарственные средства классифицируются по их механизму действия в клетке, например, насколько они оказывают влияние на клеточный цикл и на какой стадии. В качестве альтернативы агент может быть охарактеризован на основе его способности напрямую сшивать ДНК, интеркалировать в ДНК или вызывать хромосомные и митотические аберрации, оказывая влияние на синтез нуклеиновых кислот.

[0242] Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидроклорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид и урациловый иприт; нитромочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например, калихеамицин, в частности, калихеамицин гамма I и калихеамицин омега II); динемидин, включая динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неокарзиностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые энедииновые антибиотики-хромофоры, аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабин, карминомицин, карзинофиллин, хромомицин, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаларицин, оливомицин, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, келамицин, родорубицин, стрептогрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, и зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, птероптерин и триметрексат; аналоги



пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан и тестолактон; антиадренергические средства, такие как митотан и трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатраксат; дефамин; демеколцин; диазиквон; эльформитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лосоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс ПСК; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; таксоиды, например, паклитаксел и доцетаксел, гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; координационные комплексы платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; иринотекан (например, СРТ-11); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетиллорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; карбоплатин, прокарбазин, пликомицин, гемцитабиен, навельбин, ингибиторы фарнезил-протеинтрансферазы, трансплатин и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных препаратов.

### **В. Лучевая терапия**

[0243] Другие факторы, вызывающие повреждение ДНК и широко используемые, включают хорошо известные гамма-лучи, рентгеновские лучи и/или направленную доставку радиоизотопов к опухолевым клеткам. Также предусматриваются другие формы повреждающих ДНК факторов, такие как микроволны, облучение протонным пучком (патенты США № 5760395 и 4870287) и УФ-облучение. Наиболее вероятно, что все эти факторы вызывают широкий ряд повреждений ДНК, предшественников ДНК, репликации и репарации ДНК, а также сборки и поддержания хромосом. Диапазон доз для рентгеновских лучей колеблется от суточных доз от 50 до 200 рентген в течение длительных периодов времени (от 3 до 4 недель) до разовых доз от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны дозировок радиоизотопов широко варьируются и зависят от периода полураспада изотопа, силы и типа испускаемого излучения и поглощения опухолевыми клетками.

### **С. Иммунотерапия**

[0244] Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что дополнительные иммунотерапевтические средства (помимо описанной клеточной терапии)

могут использоваться в комбинации или в сочетании со способами согласно вариантам осуществления. В контексте лечения рака иммунотерапевтические средства, как правило, основаны на использовании иммунных эффекторных клеток и молекул для нацеливания и уничтожения опухолевых клеток. Ритуксимаб (RITUXAN®) является таким примером. Иммунный эффектор может представлять собой, например, антитело, специфичное к какому-либо маркеру на поверхности опухолевой клетки. Само по себе антитело может служить эффектором терапии или оно может привлекать другие клетки, чтобы фактически влиять на киллинг клеток. Антитело также может быть конъюгировано с лекарственным средством или токсином (химиотерапевтическим препаратом, радионуклидом, цепью А рицина, холерным токсином, коклюшным токсином и т.д.) и служить в качестве нацеливающего агента. Альтернативно, эффектор может представлять собой лимфоцит, несущий поверхностную молекулу, которая прямо или опосредованно взаимодействует с опухолевой клеткой-мишенью. Различные эффекторные клетки включают цитотоксические Т-клетки и NK-клетки, отличные от тех, которые имеют нокдаун или нокаут TGF-бета R2.

[0245] Конъюгаты антитело-лекарственное средство стали революционным подходом к разработке противоопухолевых препаратов. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) включают моноклональные антитела (MAb), которые ковалентно связаны с лекарственными средствами, приводящими к гибели клеток. Данный подход сочетает высокую специфичность MAb в отношении их антигенных мишеней с сильнодействующими цитотоксическими препаратами, что приводит к «вооруженным» MAb, которые доставляют полезную нагрузку (лекарственное средство) к опухолевым клеткам с повышенным уровнем антигена. Направленная доставка препарата также сводит к минимуму его воздействие на нормальные ткани, что приводит к снижению токсичности и улучшению терапевтического индекса. Одобрение FDA двух препаратов ADC, ADCETRIS® (брентуксимаб ведотин) в 2011 г. и KADCYLA® (трастузумаб эмтанзин или T-DM1) в 2013 г., подтвердило эффективность этого подхода. В настоящее время более 30 препаратов-кандидатов ADC находятся на различных стадиях клинических испытаний для лечения рака (Leal et al., 2014). Поскольку конструирование антител и оптимизация конъюгата полезная нагрузка-линкер становятся все более и более совершенными, то открытие и разработка новых ADC все больше зависят от идентификации и тестирования новых мишеней, подходящих для этого подхода, и создания нацеливающих MAb. Двумя критериями мишеней ADC являются положительная регуляция/высокий уровень экспрессии в опухолевых клетках и устойчивая интернализация.

[0246] В одном аспекте иммунотерапии опухолевая клетка должна нести какой-либо маркер, поддающийся нацеливанию, т. е. отсутствующий на большинстве других клеток. Существует множество онкомаркеров, и любой из них может быть пригодным для нацеливания в контексте настоящих вариантов осуществления. Общие опухолевые маркеры включают CD20, карциноэмбриональный антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, сиалиновый антиген Льюиса, MucA, MucB, PLAP, рецептор ламинина, erb B и

p155. Альтернативным аспектом иммунотерапии является сочетание противоопухолевых эффектов с иммуностимулирующими эффектами. Также существуют иммуностимулирующие молекулы, включающие: цитокины, такие как IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, гамма-IFN, хемокины, такие как MIP-1, MCP-1, IL-8, и факторы роста, такие как лиганд FLT3.

[0247] Примерами иммунотерапии, которые в настоящее время исследуются или применяются, являются иммунные адъюванты, например, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, динитрохлорбензол и ароматические соединения (патенты США № 5801005 и 5739169; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998); цитокиновая терапия, например интерфероны любого типа, IL-1, GM-CSF и TNF (Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998); генная терапия, например, TNF, IL-1, IL-2 и p53 (Qin et al., 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; патенты США № 5830880 и 5846945); и моноклональные антитела, например, анти-CD20, анти-ганглиозид GM2 и анти-p185 (Hollander, 2012; Hanibuchi et al., 1998; патент США № 5824311). Полагается, что один или более противоопухолевых методов лечения могут быть использованы со способами лечения антителами, описанными в настоящем документе.

[0248] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапевтический препарат может представлять собой ингибитор иммунных контрольных точек. Иммунные контрольные точки либо усиливают сигнал (например, костимулирующие молекулы), либо подавляют сигнал. Ингибирующие иммунные контрольные точки, на которые может быть нацелена блокада иммунных контрольных точек, включают рецептор аденозина A2A (A2AR), B7-H3 (также известный как CD276), аттенюатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA), цитотоксический белок 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами (CTLA-4), также известный как CD152), индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров (KIR), ген активации лимфоцитов-3 (LAG3), белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1), Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и муцин-домен 3 (TIM-3) и V-домен-содержащий Ig-супрессор активации Т-клеток (VISTA). В частности, ингибиторы иммунных контрольных точек нацелены на ось PD-1 и/или CTLA-4.

#### **D. Хирургическая операция**

[0249] Примерно 60% больных раком должны подвергаться хирургической операции того или иного типа, включая профилактические, диагностические или устанавливающие стадию, лечебные и паллиативные операции. Лечебная хирургия включает резекцию, при которой вся или часть раковой ткани физически удаляется, иссекается и/или подвергается разрушению, и может использоваться в сочетании с другими видами терапии, такими как лечение в соответствии с настоящими вариантами осуществления, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, генная терапия, иммунотерапия и/или альтернативные методы лечения. Резекция опухоли относится к физическому удалению, по меньшей мере, части опухоли. В дополнение к резекции опухоли хирургическое лечение включает лазерную хирургию, криохирургию, электрохирургию и микрографическую хирургию (операцию Мооса).

[0250] При удалении части или всех опухолевых клеток, ткани или опухоли в организме может образоваться полость. Лечение может быть выполнено перфузией, прямой инъекцией или местным нанесением на область с дополнительной противоопухолевой терапией. Такое лечение можно повторять, например, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 суток, или каждые 1, 2, 3, 4 и 5 недель, или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. Эти процедуры также могут проводиться в разных дозировках.

#### **Е. Другие агенты**

[0251] Полагается, что другие агенты можно использовать в сочетании с некоторыми аспектами вариантов осуществления настоящего изобретения для повышения терапевтической эффективности лечения. Эти дополнительные агенты включают агенты, влияющие на активацию рецепторов клеточной поверхности и щелевые соединения клеток, цитостатические агенты и агенты для дифференцировки, ингибиторы клеточной адгезии, агенты, повышающие чувствительность гиперпролиферативных клеток к индукторам апоптоза, или другие биологические агенты. Повышение межклеточной передачи сигналов за счет увеличения количества щелевых соединений клеток будет усиливать антигиперпролиферативные эффекты на соседнюю популяцию гиперпролиферативных клеток. В других вариантах осуществления цитостатические или дифференцирующие агенты можно использовать в сочетании с некоторыми аспектами вариантов осуществления настоящего изобретения для повышения антигиперпролиферативной эффективности лечения. Полагается, что ингибиторы клеточной адгезии улучшают эффективность вариантов осуществления настоящего изобретения. Примерами ингибиторов клеточной адгезии являются ингибиторы киназы фокальной адгезии (FAK) и ловастатин. Кроме того, полагается, что другие агенты, повышающие чувствительность гиперпролиферативных клеток к апоптозу, такие как антитело c225, могут быть использованы в сочетании с некоторыми аспектами вариантов осуществления настоящего изобретения для повышения эффективности лечения.

#### **VI. Векторы**

[0252] CAR, нацеленные на CD70, могут быть доставлены в реципиентную клетку, включая NK-клетку, с помощью любого подходящего вектора, включая вирусный вектор или невирусный вектор. Примеры вирусных векторов включают, по меньшей мере, ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные векторы или векторы на основе аденоассоциированного вируса. Примеры невирусных векторов включают, по меньшей мере, плазмиды, транспозоны, липиды, наночастицы, липосомы, их комбинации и т.д.

[0253] В случаях, когда NK-клетка трансдуцируется вектором, кодирующим CAR, нацеленный на CD70, и также требуется трансдукция другого гена или генов в клетке, таких как «суицидный ген», и/или цитокин, и/или необязательный терапевтический генный продукт, то CAR, нацеленный на CD70, необязательный «суицидный ген», необязательный(е) цитокин(ы) могут включаться или могут не включаться в один и тот же вектор или вместе с ним. В некоторых случаях CAR, нацеленный на CD70, «суицидный ген» и/или цитокин(ы) экспрессируются из одной и той же векторной молекулы, такой как

одна и та же молекула вирусного вектора. В таких случаях экспрессия CAR, нацеленного на CD70, «суицидного гена» и/или цитокина(ов) может регулироваться или может не регулироваться одним и тем же регуляторным элементом(ами). Когда CAR, нацеленный на CD70, «суицидный ген» и/или цитокины находятся в одном векторе, то они могут экспрессироваться или могут не экспрессироваться в виде отдельных полипептидов. В случаях, когда они экспрессируются в виде отдельных полипептидов, то они могут быть разделены в векторе элементом 2A или элементом IRES (или оба типа могут быть использованы в одном и том же векторе один или более раз), например.

[0254] Специалисты в данной области должны быть хорошо подготовленными для конструирования вектора с помощью стандартных рекомбинантных методов (см., например, монографии Sambrook et al., 2001 и Ausubel et al., 1996, обе включены в настоящий документ посредством ссылки) для экспрессии антигенных рецепторов по настоящему изобретению.

#### **А. Регуляторные элементы**

[0255] Экспрессионные кассеты, включенные в векторы, пригодные в настоящем изобретении, в частности, содержат (в направлении от 5' к 3') эукариотический промотор транскрипции, операбельно связанный с последовательностью, кодирующей белок, сигналы сплайсинга, включая промежуточные последовательности, и последовательность терминации транскрипции/полиаденилирования. Промоторы и энхансеры, которые контролируют транскрипцию генов, кодирующих белок в эукариотических клетках, могут состоять из нескольких генетических элементов. Клеточный механизм способен собирать и интегрировать регуляторную информацию, передаваемую каждым элементом, позволяя разным генам развивать различные, часто сложные паттерны регуляции транскрипции. Промотор, используемый в контексте настоящего изобретения, включает, например, конститутивные, индуцибельные и тканеспецифические промоторы. В случаях, когда вектор используется для создания противоопухолевого препарата, то промотор может быть эффективным в условиях гипоксии.

#### **В. Промотор/энхансеры**

[0256] Экспрессионные конструкции, представленные в настоящем документе, содержат промотор для регуляции экспрессии антигенного рецептора и других продуктов цистрона-гена. Промотор обычно содержит последовательность, которая функционирует для расположения стартового сайта для синтеза РНК. Наиболее известным примером этого является ТАТА-бокс, но в некоторых промоторах, не имеющих ТАТА-бокса, например, таких как промотор гена терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы млекопитающих и промотор поздних генов SV40, дискретный элемент, перекрывающий стартовый сайт, сам помогает фиксировать место инициации. Дополнительные промоторные элементы регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они располагаются в области апстрим от стартового сайта, хотя было показано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы даунстрим от стартового сайта. Чтобы поставить кодирующую последовательность «под контроль» промотора, нужно расположить 5'-конец сайта

инициации транскрипции рамки считывания транскрипции «ниже» (т.е. 3') от выбранного промотора. Промотор «апстрим» стимулирует транскрипцию ДНК и способствует экспрессии кодированной РНК.

[0257] Расстояние между элементами промотора часто является гибким, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются друг относительно друга. Например, в промоторе tk расстояние между элементами промотора может увеличиться до 50 п.н., прежде чем активность начнет снижаться. Оказалось, что в зависимости от промотора отдельные элементы могут функционировать совместно или независимо, чтобы активировать транскрипцию. Промотор может использоваться или может не использоваться в сочетании с «энхансером», который относится к цис-действующей регуляторной последовательности, участвующей в активации транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты.

[0258] Промотор может быть естественным образом ассоциирован с последовательностью нуклеиновой кислоты, которую можно получить путем выделения 5'-некодирующих последовательностей, расположенных апстрим от кодирующего сегмента и/или экзона. Такой промотор можно назвать «эндогенным». Аналогично, энхансер может быть естественным образом ассоциирован с последовательностью нуклеиновой кислоты, расположенной либо даунстрим, либо апстрим от этой последовательности. Альтернативно, определенные преимущества будут получены при размещении кодирующего сегмента нуклеиновой кислоты под контроль рекомбинантного или гетерологичного промотора, который относится к промотору, который обычно не связан с последовательностью нуклеиновой кислоты в ее естественном окружении. Рекомбинантный или гетерологичный энхансер также относится к энхансеру, обычно не связанному с последовательностью нуклеиновой кислоты в ее естественном окружении. Такие промоторы или энхансеры могут включать промоторы или энхансеры других генов, и промоторы или энхансеры, выделенные из любого другого вируса, прокариотической или эукариотической клетки, а также промоторы или энхансеры, не встречающиеся в природе, т. е. содержащие различные элементы различных областей регуляции транскрипции, и/или мутации, которые изменяют экспрессию. Например, промоторы, которые наиболее часто используются при конструировании рекомбинантной ДНК, включают промоторные системы β-лактамазы (пенициллиназы), лактозы и триптофана (trp-). В дополнение к получению последовательностей нуклеиновой кислоты промоторов и энхансеров синтетическим путем, последовательности можно получить с использованием технологий рекомбинантного клонирования и/или амплификации нуклеиновых кислот, включая ПЦР™, в связи с композициями, раскрытыми здесь. Кроме того, полагается, что также можно использовать контрольные последовательности, которые регулируют транскрипцию и/или экспрессию последовательностей в неядерных органеллах, таких как митохондрии, хлоропласты и т.п.

[0259] Естественно, будет важно использовать промотор и/или энхансер, который эффективно направляет экспрессию сегмента ДНК в органелле, типе клеток, ткани, органе

или организме, выбранных для экспрессии. Специалистам в области молекулярной биологии обычно известно применение промоторов, энхансеров и комбинаций клеточных типов для экспрессии белков (см., например, монографию Sambrook et al. 1989, включенную здесь посредством ссылки). Используемые промоторы могут быть конститутивными, тканеспецифичными, индуцибельными и/или пригодными в соответствующих условиях для регуляции экспрессии введенного ДНК-сегмента на высоком уровне, что выгодно при крупномасштабном производстве рекомбинантных белков и/или пептидов. Промотор может быть гетерологичным или эндогенным.

[0260] Кроме того, любую комбинацию промотора/энхансера (согласно, например, Базе данных эукариотических промоторов EPDB, через всемирную сеть [epd.isb-sib.ch/](http://epd.isb-sib.ch/)) также можно использовать для регуляции экспрессии. Использование цитоплазматической экспрессионной системы T3, T7 или SP6 является другим возможным вариантом осуществления. Эукариотические клетки могут поддерживать цитоплазматическую транскрипцию с некоторыми бактериальными промоторами, если предусмотрена соответствующая бактериальная полимераза либо как часть комплекса доставки, либо как дополнительная генетическая конструкция для экспрессии.

[0261] Неограничивающие примеры промоторов включают вирусные промоторы ранних или поздних генов, такие как ранние или поздние промоторы SV40, ранние промоторы цитомегаловируса (CMV), ранние промоторы вируса саркомы Рауса (RSV); промоторы эукариотических клеток, например, такие как промотор бета-актина, промотор GAPDH, промотор металлотионеина; и составные промоторы элемента ответа, такие как промоторы элемента ответа на циклический AMP (cre), промотор элемента ответа на сыворотку (sre), промотор сложного эфира форбола (TPA) и промоторы элемента ответа (tre) рядом с минимальным TATA-боксом. Также можно использовать последовательности промотора гормона роста человека (например, минимальный промотор гормона роста человека, описанный в GenBank®, идентификационный номер X05244, нуклеотиды 283-341) или промотор опухоли молочной железы мыши (доступен в ATCC, номер по каталогу ATCC 45007). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CMV IE, дектина-1, дектина-2, человеческого CD11c, F4/80, SM22, RSV, SV40, Ad MLP, бета-актина, промотор МНС класса I или МНС класса II, однако любой другой промотор, который пригоден для регуляции экспрессии терапевтического гена, применим для практики настоящего изобретения.

[0262] В некоторых аспектах способы по настоящему изобретению также относятся к энхансерным последовательностям, т.е. последовательностям нуклеиновой кислоты, которые повышают активность промотора и которые могут функционировать в цис-ориентации и независимо от их ориентации, даже на относительно больших расстояниях (до несколько килобаз от целевого промотора). Однако функция энхансера не обязательно ограничивается такими большими расстояниями, поскольку они могут также функционировать в непосредственной близости от данного промотора.

## **С. Сигналы инициации и сцепленная экспрессия**

[0263] Специфический сигнал инициации также можно использовать в экспрессионных конструкциях, представленных в настоящем описании, для эффективной трансляции кодирующих последовательностей. Такие сигналы включают кодон инициации ATG или соседние последовательности. Возможно, потребуется обеспечить экзогенные сигналы контроля трансляции, включая кодон инициации ATG. Специалисты с обычной квалификацией в данной области могут легко определить это и обеспечить необходимые сигналы. Хорошо известно, что иницирующий кодон должен находиться «в рамке считывания» с рамкой считывания желаемой кодирующей последовательности, чтобы обеспечить трансляцию полной вставки. Экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут быть природными или синтетическими. Эффективность экспрессии можно повысить за счет включения соответствующих элементов-энхансеров транскрипции.

[0264] В некоторых вариантах осуществления элементы внутренних сайтов связывания рибосомы (IRES) используются для создания мультигенных или полицистронных мРНК. Элементы IRES способны обходить модель сканирования рибосомы зависимой от 5' метилированного Cap трансляции и начинать трансляцию во внутренних сайтах. Были описаны элементы IRES от двух членов семейства пикорнавирусов (вирусы полиомиелита и энцефаломиокардита), а также IRES от мРНК млекопитающих. Элементы IRES могут быть связаны с гетерологичными открытыми рамками считывания. Несколько открытых рамок считывания могут транскрибироваться вместе, каждая из которых разделена IRES, создавая полицистронные мРНК. Благодаря элементу IRES каждая открытая рамка считывания доступна рибосомам для эффективной трансляции. Несколько генов могут быть эффективно экспрессированы с использованием одного промотора/энхансера для транскрипции одной мРНК.

[0265] Как подробно описано в других разделах настоящего документа, некоторые элементы последовательности 2A можно использовать для создания сцепленной или коэкспрессии генов в конструкциях, представленных в настоящем описании. Например, последовательности расщепления можно использовать для коэкспрессии генов посредством связывания открытых рамок считывания с образованием одного цистрона. Иллюстративной последовательностью расщепления является вирус ринита лошадей A (E2A) или F2A (вирус ящура 2A), или «2A-подобная» последовательность (например, вирус 2A *Thosea asigna*; T2A), или свиной тешовирус-1 (P2A). В конкретных вариантах осуществления в одном векторе несколько последовательностей 2A не являются идентичными, хотя в альтернативных вариантах осуществления в одном и том же векторе используются две или более одинаковых последовательностей 2A. Примеры последовательностей 2A представлены в US 2011/0065779, которая в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки.

#### **D. Ориджин репликации**

[0266] Для размножения вектора в клетке-хозяине, он может содержать один или более сайтов ориджина репликации (часто называемых «ori»), например,



последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую *oriP EBV*, как описано выше, или генетически сконструированный *oriP* с аналогичной или повышенной функцией программирования, который представляет собой специфическую последовательность нуклеиновой кислоты, с которой иницируется репликация. Альтернативно, можно использовать *ориджин* репликации другого внехромосомно реплицирующегося вируса, как описано выше, или автономно реплицирующуюся последовательность (*ARS*).

### **Е. Селекция и селектируемые маркеры**

[0267] В некоторых вариантах осуществления клетки, такие как НК-клетки, содержащие экспрессирующую анти-CD70 CAR конструкцию по настоящему изобретению, можно идентифицировать *in vitro* или *in vivo* посредством включения маркера в экспрессионный вектор. Такие маркеры будут вносить в клетку идентифицируемое изменение, позволяющее легко идентифицировать клетки, содержащие экспрессионный вектор. Как правило, селектируемый маркер представляет маркер, который придает свойство, позволяющее осуществлять селекцию. Положительный селектируемый маркер представляет собой маркер, когда присутствие маркера обеспечивает его селекцию, в то время как отрицательный селектируемый маркер представляет собой маркер, когда присутствие маркера препятствует его селекции. Примером положительного селектируемого маркера является маркер лекарственной устойчивости.

[0268] Обычно включение селектируемого по лекарственному средству маркера позволяет клонирование и идентификацию трансформантов, например, гены, которые придают устойчивость к неомицину, пурамицину, гигромицину, DHFR, GPT, зеоцину и гистидинолу, представляют собой пригодные селектируемые маркеры. В дополнение к обеспечивающим фенотип маркерам, которые дают возможность распознавать трансформантов на основе реализации состояний, также предусматриваются другие типы маркеров, в том числе скринируемые маркеры, такие как GFP, который используется в колориметрическом анализе. В качестве альтернативы, могут быть использованы скринируемые ферменты в качестве отрицательного селектируемого маркера, такие как тимидинкиназа вируса простого герпеса (*tk*) или хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (*CAT*). Специалистам в данной области также будет понятно, как использовать иммунологические маркеры, возможно в сочетании с анализом FACS. Используемый маркер не считается важным, при условии, что он способен экспрессироваться одновременно с нуклеиновой кислотой, кодирующей генный продукт. Специалистам в данной области хорошо известны другие примеры селектируемых маркеров и скринируемых маркеров.

### **VII. Клетки**

[0269] Настоящее изобретение относится к иммунным клеткам любого типа, которые содержат вектор, кодирующий CAR, нацеленный на CD70, и который также может кодировать, по меньшей мере, один цитокин и, по меньшей мере, один «суицидный ген». В некоторых случаях разные векторы кодируют CAR, и не кодируют «суицидный ген» и/или цитокин. Хотя можно использовать обычные Т-клетки, НК-клетки, гамма-дельта-Т-клетки, NKT и инвариантные НК-Т-клетки, регуляторные Т-клетки, макрофаги, В-клетки,

инфильтрирующие опухоль лимфоциты или их смесь, в отдельных случаях клетки представляют собой NK-клетки. NK-клетки можно получить из пуповинной крови, периферической крови, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), гемопоэтических стволовых клеток (HSC) или костного мозга. NK-клетки могут быть получены из клеточной линии, такой как, не ограничиваясь этим, например, клетки NK-92. NK-клеткой может быть моноклеарная клетка пуповинной крови, такая как CD56+ NK-клетка.

[0270] В некоторых случаях клетка представляет собой не иммортализованную клеточную линию, а клетку (например, первичную клетку), полученную от субъекта. Например, в некоторых случаях клетка представляет собой иммунную клетку, полученную от субъекта. Например, клетка представляет собой Т-лимфоцит, полученный от субъекта. В качестве другого примера клетка представляет собой цитотоксическую клетку, полученную от субъекта. В качестве другого примера клетка представляет собой стволовую клетку (например, стволовую клетку периферической крови) или клетку-предшественника, полученную от субъекта.

[0271] В конкретных вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению могут быть специально формулированы, и/или их можно культивировать в определенной среде. Клетки могут быть формулированы таким образом, чтобы они были пригодны для доставки реципиенту без проявления токсических эффектов.

[0272] Среда в некоторых аспектах может быть приготовлена с использованием среды, используемой для культивирования клеток животных, в качестве их базальной среды, такой как любая из AIM V, X-VIVO-15, NeuroBasal, EGM2, TeSR, BME, BGJb, CMRL 1066, Glasgow MEM, улучшенной среды MEM с добавлением цинка, IMDM, среды 199, среды Игла MEM,  $\alpha$ MEM, DMEM, Ham, RPMI-1640 и среды Фишера, а также любые их комбинации, но среда не может конкретно ограничиваться вышеуказанными средами, если она используется для культивирования животных клеток. В частности, среда может представлять собой среду, не содержащую ксенонов или иметь определенный химический состав.

[0273] Среда может представлять собой содержащую сыворотку или не содержащую сыворотки среду, или среду, не содержащую ксенонов. С точки зрения предупреждения контаминации гетерогенными компонентами животного происхождения сыворотка может быть получена от того же животного, что и стволовая(ые) клетка(и). Бессывороточная среда относится к среде без необработанной или неочищенной сыворотки и, соответственно, может включать среду с очищенными компонентами, полученными из крови, или компонентами, полученными из тканей животных (такими как факторы роста).

[0274] Среда может содержать или может не содержать какие-либо альтернативы сыворотке. Альтернативы сыворотке могут включать вещества, которые соответственно содержат альбумин (например, богатый липидами альбумин, бычий альбумин, заменители альбумина, такие как рекомбинантный альбумин или гуманизированный альбумин, растительный крахмал, декстраны и белковые гидролизаты), трансферрин (или другие

переносчики железа), жирные кислоты, инсулин, предшественники коллагена, микроэлементы, 2-меркаптоэтанол, 3'-тиолглицерин, или их эквиваленты. Альтернативы сыворотке могут быть приготовлены способом, описанным, например, в публикации международной заявки 98/30679 (в полном объеме включенной в настоящий документ). Альтернативно, для большего удобства можно использовать любые имеющиеся в продаже вещества. Коммерчески доступные вещества включают нокаутующую заменяющую сыворотку (KSR), липидный концентрат с определенным химическим составом (Gibco) и Glutamax (Gibco).

[0275] В некоторых вариантах осуществления среда может содержать один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более следующих компонентов: витамины, такие как биотин; DL альфа-токоферола ацетат; DL альфа-токоферол; витамин А (ацетат); белки, такие как BSA (бычий сывороточный альбумин) или человеческий альбумин, фракция V, не содержащая жирных кислот; каталаза; человеческий рекомбинантный инсулин; человеческий трансферрин; супероксиддисмутаза; другие компоненты, такие как кортикостерон; D-галактоза; этаноламин HCl; глутатион (восстановленный); L-карнитин гидрохлорид; линолевая кислота; линоленовая кислота; прогестерон; путресцин 2HCl; селенит натрия; и/или ТЗ (трийод-Т-тиронин). В конкретных вариантах осуществления одно или более из указанных веществ точно можно исключить.

[0276] В некоторых вариантах осуществления среда дополнительно содержит витамины. В некоторых вариантах осуществления среда содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 из следующих веществ (и любой диапазон, полученный из них): биотин, DL-альфа-токоферола ацетат, DL альфа-токоферол, витамин А, холина хлорид, кальция пантотенат, пантотеновая кислота, никотинамид-фолиевая кислота, пиридоксин, рибофлавин, тиамин, инозитол, витамин B12, или среда включает их комбинации или их соли. В некоторых вариантах осуществления среда содержит или состоит по существу из биотина, DL-альфа-токоферола ацетата, DL-альфа-токоферола, витамина А, холина хлорида, кальция пантотената, пантотеновой кислоты, никотинамида-фолиевой кислоты, пиридоксина, рибофлавина, тиамина, инозита и витамина B12. В некоторых вариантах осуществления витамины включают или состоят по существу из биотина, ацетата DL-альфа-токоферола, DL-альфа-токоферола, витамина А или их комбинаций или солей. В некоторых вариантах осуществления среда дополнительно содержит белки. В некоторых вариантах осуществления белки включают альбумин или бычий сывороточный альбумин, фракцию BSA, каталазу, инсулин, трансферрин, супероксиддисмутаза или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления среда дополнительно содержит одно или более из следующих веществ: кортикостерона, D-галактозы, этаноламина, глутатиона, L-карнитина, линолевой кислоты, линоленовой кислоты, прогестерона, путресцина, селенита натрия или трийодо-Т-тиронина, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления среда содержит одно или более из следующих веществ: добавки B-27®, добавки B-27®, не содержащей ксенонов, добавки GS21TM или их комбинации. В некоторых вариантах

осуществления среда содержит или дополнительно содержит аминокислоты, моносахариды, неорганические ионы. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты включают аргинин, цистин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, глутамин, фенилаланин, треонин, триптофан, гистидин, тирозин или валин, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления неорганические ионы включают натрий, калий, кальций, магний, азот или фосфор, или их комбинации или соли. В некоторых вариантах осуществления среда дополнительно содержит одно или более из следующих веществ: молибдена, ванадия, железа, цинка, селена, меди или марганца, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления среда включает или состоит по существу из одного или более витаминов, указанных здесь, и/или одного или более белков, указанных здесь, и/или одного или более из следующих веществ: кортикостерона, D-галактозы, этаноламина, глутатиона, L-карнитина, линолевой кислоты, линоленовой кислоты, прогестерона, путресцина, селенита натрия или трийодо-L-тиронина, добавки B-27®, добавки B-27®, не содержащей ксенов, добавки GS21TM, аминокислоты (например, аргинина, цистина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, глутамина, фенилаланина, треонина, триптофана, гистидина, тирозина или валина), моносахарид, неорганического иона (такого как натрий, калий, кальций, магний, азот и/или фосфор) или их соли, и/или молибдена, ванадия, железа, цинка, селена, меди или марганца. В конкретных вариантах осуществления одно или более из указанных веществ точно можно исключить.

[0277] Среда также может содержать одну или более добавленных извне жирных кислот или липидов, аминокислот (например, заменимых аминокислот), витаминов, факторов роста, цитокинов, антиоксидантных веществ, 2-меркаптоэтанола, пировиноградной кислоты, буферных агентов и/или неорганических солей. В конкретных вариантах осуществления одно или более из указанных веществ точно можно исключить.

[0278] Один или более компонентов среды могут быть добавлены в концентрации, по меньшей мере, не более или примерно 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 180, 200, 250 нг/л, нг/мл, мкг/мл, мг/мл, или любой диапазон, производный от него.

[0279] В конкретных вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению специфически формулированы. Они могут быть или могут не быть формулированы в виде клеточной суспензии. В отдельных случаях они формулированы в виде однократной дозы. Они могут быть формулированы для системного или местного введения. В некоторых случаях клетки формулированы для хранения перед использованием, и клеточный состав может содержать один или более агентов для криоконсервации, таких как ДМСО (например, в 5% ДМСО). Клеточный состав может содержать альбумин, включая человеческий альбумин, при этом определенный состав содержит 2,5% человеческого альбумина. Клетки можно формулировать специально для внутривенного введения; например, они предназначены для внутривенного введения в течение менее одного часа. В конкретных вариантах осуществления клетки находятся в формулированной клеточной суспензии, которая стабильна при комнатной температуре в течение 1, 2, 3 или 4 ч или более

со времени оттаивания.

[0280] В некоторых случаях иммунные клетки подвергались экспандированию перед использованием и/или перед производством. В некоторых случаях иммунные клетки представляют собой НК-клетки, которые были размножены в присутствии эффективного количества антигенпрезентирующих клеток, включая универсальные антигенпрезентирующие клетки (UAPC), в том числе в любом подходящем соотношении. Клетки можно культивировать с UAPC в соотношении от 10:1 до 1:10; от 9:1 до 1:9; от 8:1 до 1:8; от 7:1 до 1:7; от 6:1 до 1:6; от 5:1 до 1:5; от 4:1 до 1:4; от 3:1 до 1:3; 2:1 до 1:2; или 1:1, в том числе в соотношении 1:2, например. В некоторых случаях НК-клетки экспандируют в присутствии IL-2, например, в концентрации 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200, 200-500, 200-400, 200-300, 300-500, 300-400 или 400-500 Е/мл.

[0281] После генетической модификации с помощью вектора(ов) НК-клетки можно немедленно вводить или оставить для хранения. В некоторых аспектах после генетической модификации клетки могут размножаться *ex vivo* в течение суток, недель или месяцев в виде основной популяции в течение примерно 1, 2, 3, 4, 5 суток или более после переноса гена в клетки. В дополнительном аспекте трансфектанты клонируют и клон, демонстрирующий присутствие одной интегрированной или эписомально поддерживаемой экспрессионной кассеты или плазмиды, и экспрессию CD70-нацеленного CAR, экспандируют *ex vivo*. Клон, отобранный для экспансии, демонстрирует способность специфически распознавать и лизировать клетки-мишени, экспрессирующие CD70. Рекомбинантные иммунные клетки можно экспандировать путем стимуляции IL-2 или другими цитокинами, которые связывают общую гамма-цепь (например, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 и др.). Рекомбинантные иммунные клетки можно экспандировать путем стимуляции искусственными антигенпрезентирующими клетками. В еще одном аспекте генетически модифицированные клетки можно подвергнуть криоконсервации.

[0282] Варианты осуществления настоящего изобретения включают клетки, которые экспрессируют один или более CAR, нацеленных на CD70, как описано в настоящем документе. НК-клетка содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более CAR, нацеленных на CD70, и один или более сконструированных несекретируемых мембраносвязанных мутантных полипептидов TNF-альфа в конкретных вариантах осуществления. В конкретных вариантах осуществления в дополнение к экспрессии одного или более CAR, нацеленных на CD70, клетка также содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более продуктов терапевтического гена.

[0283] Клетки можно получить непосредственно от субъекта или можно получить из депозитария или другого хранилища. Клетки в качестве терапевтического средства могут быть аутологичными или аллогенными по отношению к субъекту, которому клетки предоставляются в качестве терапевтического средства.

[0284] Клетки можно получить от субъекта, нуждающегося в лечении какого-либо заболевания, и после манипуляций с ними для экспрессии CAR, нацеленного на CD70, они

могут обратно введены субъекту, от которого они были первоначально получены. В некоторых случаях клетки сохраняют для последующего использования для субъекта или другого субъекта. В таких случаях клетки могут или могут не быть дополнительно модифицированы перед применением.

[0285] NK-клетки, несущие CAR, нацеленный на CD70, могут находиться в популяции клеток, и эта популяция может иметь большинство, трансдуцированных одним или более CAR, нацеленных на CD70. Популяция клеток может включать 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 или 100% клеток, трансдуцированных одним или более CAR, нацеленных на CD70.

[0286] NK-клетки можно получить с одним или более CAR, нацеленными на CD70, с намерением быть модульными относительно конкретной цели. Например, можно создать клетки, в том числе для коммерческого распространения, экспрессирующие CAR, нацеленные на CD70, и пользователь может модифицировать их для экспрессии одного или более других представляющих интерес генов (включая терапевтические гены) в зависимости от их предполагаемой(ых) цели(ей). Например, сторона, заинтересованная в лечении CD70-положительного рака, может модифицировать их для экспрессии второго CAR для того же или другого антигена. Другие модификации клеток могут включать модификации, которые адаптируют клетки к потребностям субъекта, получающего клетки, включая потребность, специфичную для конкретного типа рака, которым страдает субъект.

### **VIII. Редактирование генома клеток**

[0287] В конкретных вариантах осуществления в клетках, содержащих анти-CD70 CAR, редактируют гены для модификации экспрессии одного или более эндогенных генов в клетке. В отдельных случаях клетки модифицируют для снижения уровня экспрессии одного или более эндогенных генов, включая ингибирование экспрессии одного или более эндогенных генов (это можно назвать нокаутом). Такие клетки могут быть или могут не быть экспандированы.

[0288] В отдельных случаях один или более эндогенных генов клеток подвергают модификации, например, с нарушенной экспрессией, когда экспрессия снижена частично или полностью. В конкретных случаях один или более генов подвергаются нокдауну или нокауту с использованием способов согласно настоящему изобретению. В определенных случаях несколько генов подвергаются нокдауну или нокауту, и это может происходить или может не происходить на одной и той же стадии их получения. Гены, которые редактируются в клетках, могут быть любого типа, но в конкретных вариантах осуществления гены представляют собой гены, генные продукты которых ингибируют активность и/или пролиферацию клеток, включая антигенспецифические, например, CD70-специфические, CAR NK-клетки, например, полученные из пуповинной крови, в качестве одного примера. В определенных случаях гены, отредактированные в антигенспецифических, например, CD70-специфических, CAR клетках, позволяют антигенспецифическим, например, CD70-специфическим, CAR клеткам функционировать более эффективно в

микроокружении опухоли. В конкретных случаях гены представляют собой один или более из NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFB2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 и CD7. В конкретных вариантах осуществления ген TGFB2 подвергается нокдауну или нокауту в антигенспецифических, например, CD70-специфических, CAR клетках.

[0289] В некоторых вариантах осуществления редактирование гена осуществляется с использованием одной или более ДНК-связывающих нуклеиновых кислот, например изменение посредством направляемой РНК эндонуклеазы (RGEN). Например, изменение может быть осуществлено с использованием коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR) и CRISPR-ассоциированных (Cas) белков; в некоторых вариантах осуществления CrF1 используется вместо Cas9. В общем, «система CRISPR» в совокупности относится к транскриптам и другим элементам, участвующим в экспрессии или регуляции активности CRISPR-ассоциированных («Cas») генов, включая последовательности, кодирующие ген Cas, последовательность tracr (транскрибирующая CRISPR) (например, tracrРНК или активная неполная tracrРНК), последовательность tracr-mate (включающая «прямой повтор» и tracrRNA-процессированный частичный прямой повтор в контексте эндогенной системы CRISPR), направляющая последовательность (также называемая «спейсер» в контексте эндогенной системы CRISPR) и/или другие последовательности и транскрипты из локуса CRISPR.

[0290] Система нуклеазы CRISPR/Cas или нуклеазы CRISPR/Cas может включать некодирующую молекулу РНК (направляющую) РНК, которая специфически связывается с ДНК, и белок Cas (например, Cas9) с нуклеазной функциональностью (например, два нуклеазных домена). Один или более элементов системы CRISPR могут происходить из системы CRISPR типа I, типа II или типа III, например, из определенного организма, содержащего эндогенную систему CRISPR, такого как *Streptococcus pyogenes*.

[0291] В некоторых аспектах нуклеаза Cas и gРНК (включая слитую конструкцию crРНК, специфичной для последовательности-мишени, и фиксированной tracrРНК). В общем, сайты-мишени на 5'-конце gРНК нацеливают нуклеазу Cas на сайт-мишень, например, ген, используя комплементарное спаривание оснований. Сайт-мишень может быть выбран на основе его расположения непосредственно 5' от последовательности протоспейсера, смежного с последовательностью мотива (PAM), обычно такого как NGG или NAG. В этом отношении gРНК нацелена на желаемую последовательность посредством модификации первых 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 14, 12, 11 или 10 нуклеотидов направляющей РНК, чтобы они соответствовали целевой последовательности ДНК. В общем, система CRISPR характеризуется элементами, которые способствуют образованию комплекса CRISPR в сайте последовательности-мишени. Как правило, «последовательность-мишень» обычно относится к последовательности, для которой сконструирована направляющая последовательность для обеспечения комплементарности, при этом гибридизация между последовательностью-мишенью и направляющей

последовательностью способствует образованию комплекса CRISPR. Полная комплементарность не обязательно требуется, при условии, что уровень комплементарности является достаточным, чтобы обеспечить гибридизацию и способствовать образованию комплекса CRISPR.

[0292] Система CRISPR может индуцировать двухцепочечные разрывы (DSB) в целевом сайте с последующими нарушениями или изменениями, описанными здесь. В других вариантах осуществления варианты Cas9, называемые «никазами», используются для создания одноцепочечного разрыва в целевом сайте. Парные никазы можно использовать, например, для повышения специфичности, каждая из которых регулируется парой различных последовательностей gPHK, нацеленных таким образом, что при одновременном введении приказ вводится 5'-выступ. В других вариантах осуществления каталитически неактивная Cas9 слита с гетерологичным эффекторным доменом, таким как репрессор или активатор транскрипции, для воздействия на экспрессию гена.

[0293] Последовательность-мишень может содержать любой полинуклеотид, такой как полинуклеотиды ДНК или РНК. Последовательность-мишень может располагаться в ядре или цитоплазме клетки, например, внутри органеллы клетки. Как правило, последовательность или матрица, которую можно использовать для рекомбинации в целевой локус, содержащий последовательности-мишени, называют «матрицей редактирования», или «полинуклеотидом редактирования», или «последовательностью редактирования». В некоторых аспектах экзогенный полинуклеотид-матрица может относиться к матрице для редактирования. В некоторых аспектах рекомбинация представляет собой гомологичную рекомбинацию.

[0294] Как правило, в контексте эндогенной системы CRISPR образование комплекса CRISPR (содержащего направляющую последовательность, гибридизованную с последовательностью-мишенью и образующую комплекс с одним или более белками Cas) приводит к расщеплению одной или обеих цепей в или рядом (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или более пар нуклеотидов от последовательности-мишени). Последовательность tracr, которая может содержать или состоять из всей или части последовательности tracr дикого типа (например, примерно или более чем примерно 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85 или более нуклеотидов последовательности tracr дикого типа), также может образовывать часть комплекса CRISPR, например, посредством гибридизации, по меньшей мере, части последовательности tracr со всей или частью сопряженной последовательности tracr, которая функционально связана с направляющей последовательностью. Последовательность tracr имеет достаточный уровень комплементарности с последовательностью tracr mate для обеспечения гибридизации и участия в формировании комплекса CRISPR, например, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% комплементарность последовательности по длине последовательности tracr mate при оптимальном выравнивании.

[0295] Один или более векторов, запускающих экспрессию одного или более элементов системы CRISPR, встраивают в клетку таким образом, что экспрессия элементов



системы CRISPR направляет образование комплекса CRISPR в одном или более сайтах-мишенях. Компоненты также могут быть доставлены в клетки в виде белков и/или РНК. Например, каждый из фермента Cas, направляющей последовательности, связанной с последовательностью *tracr* mate, и последовательности *tracr* можно операбельно связать с отдельными регуляторными элементами на отдельных векторах. Альтернативно, два или более элементов, экспрессирующихся из одних и тех же или разных регуляторных элементов, можно объединить в одном векторе, при этом один или более дополнительных векторов несут любые компоненты системы CRISPR, не включенные в первый вектор. Вектор может содержать один или более сайтов инсерции, таких как последовательность распознавания эндонуклеазы рестрикции (также называемая «сайтом клонирования»). В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов инсерции располагается апстрим и/или даунстрим от одного или более элементов последовательности одного или более векторов. При использовании нескольких различных направляющих последовательностей можно использовать одну экспрессионную конструкцию для нацеливания активности CRISPR на несколько различных соответствующих последовательностей-мишеней внутри клетки.

[0296] Вектор может содержать регуляторный элемент, операбельно связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей фермент CRISPR, такой как белок Cas. Неограничивающие примеры белков Cas включают Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известные как Csn1 и Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, CMR1, CMR3, CMR4, CMR5, CMR6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, ЧФЛ, Csf2, Csf3, Csf4, Cpf1 (Cas12a), их гомологи или их модифицированные варианты. Эти ферменты известны; например, аминокислотную последовательность белка Cas9 *S. pyogenes* можно найти в базе данных SwissProt под идентификационным номером Q99ZW2.

[0297] Фермент CRISPR может представлять собой Cas9 (например, из *S. pyogenes* или *S. pneumoniae*). В некоторых случаях вместо Cas9 в качестве эндонуклеазы можно использовать Cpf1 (Cas12a). Фермент CRISPR может направлять расщепление одной или обеих цепей в сайте расположения последовательности-мишени, например, в пределах последовательности-мишени и/или в пределах комплементарной последовательности-мишени. Вектор может кодировать фермент CRISPR, который мутирован относительно соответствующего фермента дикого типа, так что мутантный фермент CRISPR не способен расщеплять одну или обе цепи целевого полинуклеотида, содержащего последовательность-мишень. Например, замена аспартата на аланин (D10A) в каталитическом домене RuvC I Cas9 из *S. pyogenes* превращает Cas9 из нуклеазы, которая расщепляет обе цепи, в никазу (расщепляет одну цепь). В некоторых вариантах осуществления никаза Cas9 может использоваться в сочетании с направляющей последовательностью(ями), например, двумя направляющими последовательностями, которые нацелены соответственно на смысловую и антисмысловую цепи ДНК-мишени.

Такая комбинация позволяет никировать обе цепи и использовать их для индукции NHEJ или HDR.

[0298] В некоторых вариантах осуществления кодирующая фермент последовательность, кодирующая фермент CRISPR, является кодон-оптимизированной для экспрессии в определенных клетках, таких как эукариотические клетки. Эукариотические клетки могут представлять собой клетки или производные от конкретного организма, такого как млекопитающее, включая, не ограничиваясь этим, человека, мышь, крысу, кролика, собаку или примата, отличного от человека. В общем, оптимизация кодонов относится к способу модификации последовательности нуклеиновой кислоты для повышения экспрессии в представляющих интерес клетках-хозяевах посредством замены, по меньшей мере, одного кодона нативной последовательности кодонами, которые чаще или чаще всего используются в генах этого клетки-хозяина при сохранении нативной аминокислотной последовательности. У различных видов наблюдают конкретное отклонение в пользу конкретных кодонов для конкретной аминокислоты. Отклонение в использовании кодонов (различия в использовании кодонов между организмами) часто коррелирует с эффективностью трансляции матричной РНК (мРНК), которая, в свою очередь, как полагают, зависит, в частности, от свойств транслируемых кодонов и доступности конкретных молекул транспортной РНК (тРНК). Преобладание выбранных тРНК в клетке, как правило, является отражением кодонов, чаще всего используемых в синтезе пептидов. Таким образом, гены можно адаптировать для оптимальной экспрессии гена в указанном организме на основе оптимизации кодонов.

[0299] Как правило, направляющая последовательность представляет собой любую полинуклеотидную последовательность, имеющую достаточную комплементарность с целевой полинуклеотидной последовательности для гибридизации с целевой последовательностью и прямого связывания комплекса CRISPR с последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между направляющей последовательностью и соответствующей последовательностью-мишенью при оптимальном выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания составляет примерно или более чем примерно 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или выше.

[0300] Оптимальное выравнивание можно определить с использованием любого подходящего алгоритма выравнивания последовательностей, не ограничивающий пример которого включает алгоритм Смита-Уотермана, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритмы, основанные на преобразовании Берроуза-Уилера (например, алгоритм Берроуза). Wheeler Aligner), Clustal W, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies, ELAND (Illumina, San Diego, Calif.), SOAP (доступно на [soap.genomics.org.cn](http://soap.genomics.org.cn)) и Maq (доступно на [maq.sourceforge.net](http://maq.sourceforge.net)).

[0301] Фермент CRISPR может быть частью слитого белка, содержащего один или более доменов гетерологичного белка. Слитый белок фермента CRISPR может содержать любую дополнительную белковую последовательность и необязательно линкерную

последовательность между любыми двумя доменами. Примеры белковых доменов, которые могут быть слиты с ферментом CRISPR, включают, помимо прочего, эпитопные метки, последовательности репортерных генов и белковые домены, имеющие одну или более из следующих активностей: метилазную активность, деметилазную активность, активирующую транскрипцию активность, репрессирующую транскрипцию активность, активность фактора высвобождения транскрипта, гистон-модифицирующую активность, РНК-расщепляющую активность и активность связывания нуклеиновой кислоты. Неограничивающие примеры эпитопных меток включают гистидиновые метки (His), метки V5, метки FLAG, метки гемагглютинаина вируса гриппа (HA), метки Мус, метки VSV-G и тиоредоксиновые метки (Trx). Примеры репортерных генов включают глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), HcRed, DsRed, голубой флуоресцентный белок (CFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) и аутофлуоресцентные белки, включая синий флуоресцентный белок (BFP). Фермент CRISPR можно подвергнуть слиянию с последовательностью гена, кодирующей белок или фрагмент белка, связывающий молекулы ДНК или другие клеточные молекулы, включая, в качестве неограничивающих примеров, мальтоза-связывающий белок (MBP), S-метку, слитые белки ДНК-связывающего домена (DBD) Lex A, слитые белки ДНК-связывающего домена GAL4A и слитые белки белка BP16 вируса простого герпеса (HSV). Дополнительные домены, которые могут являться частью слитого белка, содержащего фермент CRISPR, описаны в US20110059502, включенном в настоящее описание посредством ссылки.

## **IX. Способы лечения**

[0302] В различных осуществлениях конструкции CAR, последовательности нуклеиновых кислот, векторы, клетки-хозяева и т.д., нацеленные на CD70, описанные в настоящем документе, и/или фармацевтические композиции, содержащие их, используются для профилактики, лечения или облегчения злокачественного заболевания, такого как онкологическое заболевание. В конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть особенно пригодной для профилактики, облегчения и/или лечения злокачественной опухоли, включая злокачественную опухоль, которая экспрессирует CD70 и которая может быть или может не быть солидной опухолью, например. Субъект может использовать способ лечения по настоящему изобретению в качестве начального лечения или после (или вместе с) другого лечения, например, такого как HSCT. Способы иммунотерапии могут быть адаптированы к потребностям субъекта с раком в зависимости от типа и/или стадии рака, и, по меньшей мере, в некоторых случаях иммунотерапия может быть изменена в ходе курса лечения субъекта.

[0303] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам иммунотерапии, включающим введение эффективного количества клеток, полученных способами по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления

заболевание или расстройство внутренних органов лечат посредством переноса клеточных популяций, полученных описанными здесь способами и вызывающих иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак лечат путем переноса клеточной популяции, полученной способами по настоящему изобретению и индуцирующей иммунный ответ. В настоящем документе описаны способы лечения или замедления прогрессирования рака у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества CD70-специфической клеточной терапии. Настоящие способы могут применяться для лечения солидных опухолей или гематологических злокачественных новообразований.

[0304] Опухоли, для которых пригодны способы лечения по настоящему изобретению, включают любой тип злокачественных клеток, например, обнаруживаемый в солидной опухоли или гематологическом новообразовании. Типичные солидные опухоли могут включать, не ограничиваясь этим, опухоль органа, выбранного из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза, лимфомы, рака легкого, рака почки, рака мочевого пузыря, меланомы, глиобластомы, рака молочной железы, рака головы и шеи, мезотелиомы, множественной миеломы и рака поджелудочной железы.

[0305] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммунные клетки, экспрессирующие анти-CD70 CAR, доставляют субъекту, нуждающемуся в этом, такому как субъект, страдающий раком. Затем клетки стимулируют иммунную систему субъекта, чтобы «атаковать» опухолевые клетки. В некоторых случаях субъекту вводят одну или более доз иммунных клеток. В случаях, когда субъекту вводят две или более доз иммунных клеток, то продолжительность между введениями должна быть достаточной, чтобы дать время для размножения в организме субъекта, и в конкретных вариантах осуществления продолжительность между дозами составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и более суток.

[0306] NK-клетки, для которых используется CAR, нацеленный на CD70, могут представлять собой NK, T-клетки или инвариантные NKT-клетки, сконструированные для клеточной терапии для млекопитающих, в конкретных вариантах осуществления. В таких случаях, когда клетки представляют собой NK-клетки, то терапия NK-клетками может быть любого типа, и NK-клетки могут быть любого типа. В конкретных вариантах осуществления клетки представляют собой NK-клетки, которые были сконструированы для экспрессии одного или более CAR, нацеленных на CD70, и которые вводят субъекту в терапевтически эффективном количестве (в диапазоне от  $10^3$  до  $10^{10}$ ), которое облегчает, по меньшей мере, один симптом, связанный с CD70-экспрессирующими клетками у субъекта. В конкретных вариантах осуществления клетки представляют собой NK-клетки, трансдуцированные CAR, нацеленным на CD70. Терапевтически эффективное количество может составлять от  $10^3$  до  $10^{10}$ , от  $10^3$  до  $10^9$ , от  $10^3$  до  $10^8$ , от  $10^3$  до  $10^7$ , от  $10^3$  до  $10^6$ , от  $10^3$  до  $10^5$ , от  $10^3$  до  $10^4$ , от  $10^4$  до  $10^{10}$ , от  $10^4$  до  $10^9$ , от  $10^4$  до  $10^8$ , от  $10^4$  до  $10^7$ ,  $10^4$  до  $10^6$ ,  $10^4$  до  $10^5$ ,  $10^5$  до  $10^{10}$ ,  $10^5$  до  $10^9$ ,  $10^5$  до  $10^8$ ,  $10^5$  до  $10^7$ ,  $10^5$  до  $10^6$ ,  $10^6$  до  $10^{10}$ ,  $10^6$  до  $10^9$ ,  $10^6$  до  $10^8$ ,  $10^6$  до  $10^7$ ,  $10^7$  до  $10^{10}$ ,  $10^7$  до  $10^9$ ,  $10^7$  до  $10^8$ ,  $10^8$  до  $10^{10}$ ,  $10^8$  до  $10^9$  или  $10^9$  до  $10^{10}$  клеток. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления субъекту, имеющему

CD70-положительный рак, вводят один или более раз терапевтически эффективное количество клеток, экспрессирующих один или более CAR, нацеленных на CD70, включая NK-клетки.

[0307] В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение частично относится к клеткам, экспрессирующим CD70 CAR, конструкции CAR, нацеленные на CD70, молекулы нуклеиновой кислоты CAR, нацеленные на CD70, и векторы CAR, нацеленные на CD70, которые можно вводить самостоятельно или в любой комбинации с использованием стандартных векторов и/или систем доставки генов и, по меньшей мере, в некоторых аспектах вместе с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. В некоторых вариантах осуществления после введения молекулы нуклеиновой кислоты или векторы могут стабильно интегрировать в геном субъекта.

[0308] В конкретных вариантах осуществления можно использовать вирусные векторы, которые специфичны для определенных клеток или тканей, и являются перзистентными, например, в NK-клетках. Подходящие фармацевтические носители и эксципиенты хорошо известны в данной области. Композиции, приготовленные в соответствии с изобретением, можно использовать для профилактики, лечения или замедления вышеуказанных заболеваний.

[0309] Кроме того, изобретение относится к способу профилактики, лечения или облегчения онкологического заболевания, включающему стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клеток, которые экспрессируют CAR, нацеленный на CD70, последовательности нуклеиновой кислоты, вектора, которые описаны в настоящем документе, и/или полученного способом, описанным в настоящем документе.

[0310] Возможными показаниями для введения композиции(ий) иллюстративных CD70-нацеленных клеток CAR являются злокачественные заболевания, включая онкологические заболевания, включая, например, В-клеточные злокачественные новообразования, множественную миелому, рак молочной железы или рак легких. Типичными показаниями для введения композиции(ий) клеток CAR, нацеленных на CD70, являются злокачественные заболевания, включая любые злокачественные новообразования, которые экспрессируют CD70. Введение композиции(ий) по настоящему изобретению применимо для всех стадий и типов рака, включая, например, минимальное остаточное заболевание, рак на ранних стадиях, распространенный рак и/или метастатический рак, и/или рефрактерный рак.

[0311] Терапевтически эффективные количества продуцированных клеток можно вводить рядом путей, включая парентеральное введение, например, внутривенное, внутрибрюшинное, внутримышечное, интратермальное, интратуморальное, интратекальное, внутрижелудочковое, через резервуар, внутрисуставную инъекцию или инфузию.

[0312] Терапевтически эффективное количество продуцированных клеток для применения в адоптивной клеточной терапии представляет собой такое количество, при

котором достигается желаемый эффект у субъекта, подвергающегося лечению. Например, это может быть количество иммунных клеток, необходимое для подавления прогрессирования или для регрессии рака.

[0313] Продуцированную клеточную популяцию можно вводить по схемам лечения, соответствующим заболеванию, например, в однократной дозе или нескольких дозах в течение одного или более дней для облегчения болезненного состояния, или с использованием периодических доз в течение длительного времени для подавления прогрессирования заболевания и предупреждения рецидива заболевания. Точная доза, которую следует использовать в составе, также будет зависеть от пути введения и тяжести заболевания или расстройства и должна определяться в соответствии с решением лечащего врача и обстоятельствами для каждого пациента. Терапевтически эффективное количество клеток будет зависеть от субъекта, которого лечат, тяжести и типа заболевания и способа введения. В некоторых вариантах осуществления дозы, которые можно использовать в лечении людей, составляют по меньшей мере  $1 \times 10^3$ , по меньшей мере  $1 \times 10^4$ ,  $3,8 \times 10^4$ , по меньшей мере  $3,8 \times 10^5$ , по меньшей мере  $3,8 \times 10^6$ , по меньшей мере  $3,8 \times 10^7$ , по меньшей мере  $3,8 \times 10^8$ , не менее  $3,8 \times 10^9$  или не менее  $3,8 \times 10^{10}$  Т-клеток/ $\text{м}^2$ . В определенном варианте осуществления доза, используемая при лечении людей, составляет примерно от  $3,8 \times 10^9$  до примерно  $3,8 \times 10^{10}$  Т-клеток/ $\text{м}^2$ . В дополнительных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество Т-клеток может варьироваться примерно от  $5 \times 10^6$  клеток на кг массы тела до примерно  $7,5 \times 10^8$  клеток на кг массы тела, например, примерно от  $2 \times 10^7$  клеток до примерно  $5 \times 10^8$  клеток на кг массы тела или примерно от  $5 \times 10^7$  клеток до примерно  $2 \times 10^8$  клеток на кг массы тела. Точное количество Т-клеток могут легко определить специалисты в данной области с учетом возраста, массы тела, пола и физиологического состояния субъекта. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых доза-ответная реакция, полученных в тест-системах *in vitro* или на животных моделях.

[0314] Настоящее изобретение также относится к протоколам совместного введения с другими соединениями, например, конструкциями биспецифических антител, направленными токсинами или другими соединения, которые функционируют через иммунные клетки. Клинический режим совместного введения соединения(ий) по изобретению может включать одновременное введение, до или после введения другого компонента. Конкретные комбинированные методы лечения включают химиотерапию, лучевую терапию, хирургическое вмешательство, гормональную терапию или другие виды иммунотерапии.

[0315] Варианты осуществления изобретения относятся к набору, содержащему конструкцию CAR, нацеленный на CD70, как определено в настоящем документе, последовательность нуклеиновой кислоты, как определено в настоящем документе, вектор, как определено в настоящем документе, и/или хозяин, как определено в настоящем документе. Также предусматривается, что набор по настоящему изобретению содержит фармацевтическую композицию, как описано выше, либо отдельно, либо в комбинации с

дополнительными лекарственными средствами, предназначенными для введения субъекту, нуждающемуся в лечении или вмешательстве.

#### **Х. Наборы по изобретению**

[0316] Любую из композиций, описанных здесь, можно включить в набор. В неограничивающем примере набор включает молекулы анти-CD70 CAR, клетки, включающие их, и/или реагенты для их получения, и любой из них может быть помещен в подходящие контейнеры в наборе по настоящему изобретению. Наборы могут включать иммунные клетки, включая NK-клетки, векторы, полинуклеотиды экспрессионной конструкции для встраивания в вектор (вирусный или невирусный), последовательности CD27 любого типа, как описано в настоящем документе, и так далее. Можно включить праймеры для амплификации любого полинуклеотида. В некоторых случаях набор включает криоконсервированные клетки, в том числе NK-клетки. Могут быть включены любые реагенты для трансфекции или трансдукции клеток.

[0317] Композиции наборов могут быть упакованы либо в водной среде, либо в лиофилизированной форме. Контейнеры в наборах обычно включают, по меньшей мере, один флакон, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другие контейнеры, в которые можно поместить один или более компонентов и, предпочтительно, соответствующим образом разделить на аликвотные порции. Если в набор входит более одного компонента, то набор также может обычно содержать второй, третий или другой дополнительный контейнер, в которые могут быть помещены дополнительные компоненты по отдельности. Однако во флаконе могут содержаться различные комбинации компонентов. Наборы по настоящему изобретению также обычно будут включать средства для содержания молекул анти-CD70 CAR, клеток, включающих их, и/или реагентов для их получения в закрытом виде для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать в себя пластмассовые контейнеры, изготовленные методом литья или формованные раздувом, в которых находятся желаемые флаконы.

[0318] Когда компоненты набора обеспечиваются в виде одного и/или более жидких растворов, то жидкий раствор представляет собой водный раствор, при этом, в частности, предусматривается стерильный водный раствор. Композиции также могут быть приготовлены в виде композиции для введения шприцем. В этом случае контейнер сам по себе может представлять собой шприц, пипетку и/или другое подобное устройство, из которого состав можно наносить на инфицированный участок тела, вводить животному и/или даже наносить на и/или смешать с другими компонентами набора.

[0319] Однако компоненты набора могут поставляться в виде сухих порошков. Когда реагенты и/или компоненты поставляются в виде сухого порошка, то порошок можно восстановить путем добавления подходящего растворителя. Полагается, что растворитель также может находиться в другом контейнере.

[0320] Независимо от количества и/или типа контейнеров, наборы по настоящему изобретению могут также содержать и/или быть упакованы вместе с инструментом для помощи при инъекции/введении и/или размещении конечной композиции в теле

животного. Такой инструмент может представлять собой шприц, пипетку, пинцет и/или любое подобное, одобренное с медицинской точки зрения средство доставки. В некоторых вариантах осуществления в набор для применения *ex vivo* включаются реагенты, устройства или контейнеры.

### **Примеры**

[0321] Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что способы, раскрытые в примерах, которые следуют, представляют собой способы, подобранные авторами изобретения, которые хорошо функционируют при практическом применении изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться в качестве представляющих собой предпочтительные способы его практического применения. Однако специалистам в данной области техники будет понятно, в свете настоящего раскрытия, что многие изменения могут быть внесены в раскрытые конкретные варианты осуществления и при этом получить аналогичный или сходный результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

#### **Пример 1**

##### **CD27-содержащий CAR для нацеливания на CD70-положительные опухоли**

[0322] Авторы изобретения впервые подтвердили экспрессию CD70 в образцах пациентов с AML. График Tsne по данным масс-цитометрии показал высокую экспрессию CD70 на клеточных образцах при первичном AML (n=54), но не на здоровых клетках СВ CD34+ (n=10) (фиг. 1A). Как показано на фиг. 1B, на графиках Tsne также показаны различные миелоидные маркеры на линиях отрицательных клеток из СВ (верхняя популяция СВ на фиг. 1A) и образцы AML (нижняя популяция AML на фиг. 1A). Экспрессия CD70 в образцах AML была сходной с другими хорошо охарактеризованными миелоидными маркерами.

[0323] На фиг. 3 показано, что конструкции TrCD27 демонстрируют более высокую эффективность трансфекции по сравнению с конструкциями flCD27. Клетки 293T трансфектировали различными конструкциями CD27, как показано на фигуре, с использованием GeneJuice в качестве реагента для трансфекции. Эффективность трансфекции определяли тестированием поверхностной экспрессии CD27 на клетках 293T после сбора вируса с использованием проточной цитометрии для конструкций CD27. В качестве контроля использовали нетрансдуцированные (NT) клетки. Авторы изобретения также включили конструкции, содержащие только IL15 (т.е. IL15), и конструкцию CD70scFv CAR, содержащую одну тяжелую и легкую цепи, полученные из коммерчески доступной последовательности антитела CD70 с IL15 (т.е. CD70-IL15). Поверхностную экспрессию IgG использовали для определения эффективности трансфекции для двух последних конструкций.

[0324] На фиг. 4 показано, что конструкции TrCD27 демонстрировали более высокую эффективность трансдукции по сравнению с конструкциями flCD27. Ретровирусный супернатант, собранный в эксперименте по трансфекции (фиг. 3),



использовали для трансдукции NK-клеток (CBNK), полученных из пуповинной крови, и RetroNectin использовали для повышения эффективности трансдукции. Через 48 ч после трансдукции эффективность трансдукции оценивали анализом поверхностной экспрессии CD27 на клетках CBNK с использованием проточной цитометрии. В качестве контроля использовали супернатант нетрансдуцированных (NT) клеток. Для конструкций IL15 и CD70 CAR-IL15 CAR для определения эффективности трансдукции использовали поверхностную экспрессию IgG на клетках CBNK. Поскольку конструкции fCD27 в этих условиях демонстрируют низкую эффективность трансфекции и трансдукции, особое внимание было уделено конструкциям trCD27.

[0325] На фиг. 5A-5C показано, что клетки CBNK, трансдуцированные конструкциями trCD27, индуцировали апоптоз опухолевых клеток. Анализ с окрашиванием Annexin V-LIVE/DEAD™ Fixable Aqua проводили для исследования того, насколько клетки CBNK, трансдуцированные различными конструкциями trCD27, могут индуцировать гибель CD70-экспрессирующих опухолевых клеток. Клетки Raji и Karpas использовали в качестве мишеней, поскольку обе имеют относительно высокую поверхностную экспрессию CD70 (фиг. 5A и фиг. 5B соответственно). NK-клетки, трансдуцированные конструкциями TrCD27, и опухолевые клетки сокультивировали в соотношении 1:1 в течение 4 ч и проводили окрашивание Annexin V-LIVE/DEAD™ Fixable Aqua. Различные клетки CBNK, трансдуцированные trCD70 (таким как № 3, № 13, № 15, № 17, № 19, № 20 и т. д.), обеспечивали высокий киллинг как клеток Raji (черный столбец полоса), так и клеток Karpas (серый столбец) по сравнению с клеткам CBNK, трансдуцированными NT, IL15 или CD70-IL15 CAR (фиг. 5C).

[0326] На фиг. 6 показано, что клетки CB-NK, трансдуцированные конструкциями trCD27, проявляли повышенную цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток. Маркер дегрануляции CD107a является широко распространенным маркером цитотоксической активности NK-клеток. Клетки CBNK, трансдуцированные TrCD27 CAR, и опухолевые клетки (Raji и Karpas) сокультивировали в соотношении 1:1 в присутствии антитела CD107a в течение 6 ч. После инкубации экспрессию CD107a оценивали с использованием проточной цитометрии. Большинство трансдуцированных trCD70 клеток CB-NK проявляли повышенную цитотоксическую активность в отношении клеток Raji (средний черный столбец) и Karpas (правый серый столбец) по сравнению с клетками CB-NK, трансдуцированными NT, IL15 или CD70-IL15 CAR. Клетки CB-NK в отсутствие сокультивирования с опухолевыми клетками демонстрируют минимальный базовый уровень экспрессии CD107a (левый зеленый столбец).

[0327] На фиг. 7A-7B показано, что клетки CB-NK, трансдуцированные конструкциями trCD27, проявляли повышенную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток. Для анализа цитотоксической активности клеток CBNK, трансдуцированных trCD27 CAR, в режиме реального времени против опухолевых клеток был проводили анализ цитотоксичности IncuCyte. Клетки CB-NK, трансдуцированные TrCD27 CAR, и клетки Raji (фиг. 7A) или клетки Karpas (фиг. 7B) сокультивировали в

соотношении 1:1, и цитотоксичность НК-клеток оценивали в режиме реального времени в отношении клеток Raji и Karpas каждый час в течение 12 ч. Все клетки СВ-НК, трансдуцированные trCD70 CAR, использованные в этом анализе, показали повышенную цитотоксическую активность в отношении клеток Raji (левая панель) и клеток Karpas (правая панель) по сравнению с клетками СВ-НК, трансдуцированными NT, IL15 или CD70-IL15 CAR.

[0328] На фиг. 8А-8В показано, что клетки СВ-НК, трансдуцированные CAR trCD27, обладали эффективной противоопухолевой активностью в отношении CD70-положительных клеток Raji *in vivo*. Мышам NSG прививали клетки Raji, меченные люциферазой светлячка (Raji-FFluc), которые имеют высокую экспрессию CD70. Мышам вводили 20000 клеток Raji/мышь и 5М клеток СВНК/мышь. Результаты биолуминесцентной визуализации опухоли показали, что клетки СВ-НК, трансдуцированные CAR trCD27, были способны уменьшать опухолевую нагрузку за счет высокого уровня экспрессии CD70 на клетках Raji (фиг. 8А). Кроме того, кривая выживаемости показала достоверное повышение выживаемости мышей NSG с Raji при введении однократной дозы клеток СВ-НК, трансдуцированных различными CAR trCD27, по сравнению с нетрансдуцированными (NT) клетками и клетками, трансдуцированными IL15 или CD70-IL15 CAR. (Фиг.8В). Конструкция CAR trCD27 № 23 показала наиболее значительное повышение выживаемости.  $p=0,002$  (Raji+NT против Raji+CD27 № 23);  $p=0,0018$  (Raji+IL15 против Raji+CD27 № 23);  $p=0,001$  (Раджи+CD70-IL15 против Раджи+CD27 № 23). Критерий Мантеля-Кокса использовался для измерения значения  $p$ .

[0329] На фиг. 9А-9В показано, что клетки СВ-НК, трансдуцированные CAR trCD27, обладали эффективной противоопухолевой активностью в отношении CD70-положительных клеток AML *in vivo*. Мышам NSG прививали меченные люциферазой светлячка клетки THP-1 (THP1-FFluc), которые имеют высокую экспрессию CD70. Мышам вводили 100000 клеток THP1/мышь и 5М клеток СВНК/мышь. Результаты биолуминесцентной визуализации опухоли показали, что клетки СВ-НК, трансдуцированные CAR trCD27, были способны снижать опухолевую нагрузку за счет высокого уровня экспрессии CD70 на клетках THP-1 (фиг. 9А). Кроме того, кривые выживаемости показали достоверное повышение выживаемости мышей NSG с THP-1 при введении однократной дозы клеток СВ-НК, трансдуцированных различными CAR trCD27, по сравнению с нетрансдуцированными (NT) клетками и клетками, трансдуцированными IL15 или CD70-IL-15 (фиг. 9В). Конструкции CAR trCD27 № 15 и trCD27 № 23 показали наиболее значительное улучшение выживаемости.  $p=0,0027$  (THP-1+NT против THP-1+CD27 № 15 или № 23);  $p=0,001$  (THP-1+IL15 против THP-1+CD27 № 15 или № 23);  $p=0,001$  (THP-1+CD70-IL15 против THP-1+CD27 № 15 или № 23). Критерий Мантеля-Кокса использовали для измерения значения  $p$ .

[0330] Несмотря на то, что настоящее изобретение и его преимущества были подробно описаны, следует понимать, что могут быть сделаны различные изменения, замены и модификации, не отступая от сущности и объема конструкции, как определено

прилагаемой формулой изобретения. Кроме того, объем настоящей заявки не предназначен для ограничения конкретными вариантами осуществления способа, устройства, производства, состава вещества, средств, способов и стадий, описанных здесь. Как будет понятно специалистам в данной области из настоящего раскрытия, способы, устройства, производство, композиции веществ, средства, способы или стадии, имеющиеся в настоящее время или которые будут разработаны в будущем, которые выполняют по существу одинаковую функцию или достигают по существу одинакового результата, что и соответствующие варианты осуществления, описанные здесь, могут быть использованы по настоящему раскрытию. Следовательно, прилагаемая формула изобретения включает в себя такие способы, устройства, производство, композиции веществ, средства, способы или стадии.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид, кодирующий анти-CD70 химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий сигнальный пептид, анти-CD70 антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и, по меньшей мере, один внутриклеточный домен, где анти-CD70 антигенсвязывающий домен не содержит антитело, и где необязательно трансмембранный домен CAR не является трансмембранным доменом CD27.
2. Полинуклеотид по п.1, где анти-CD70 антигенсвязывающий домен находится во внеклеточном домене CD27.
3. Полинуклеотид по пп.1 или 2, где CAR содержит антигенсвязывающий домен CD27, который является кодон-оптимизированным.
4. Полинуклеотид по пп.1, 2 или 3, где антигенсвязывающий домен содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO:2.
5. Полинуклеотид по любому из пп.1, 2 или 3, где антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен содержат, состоят или по существу состоят из SEQ ID NO:1.
6. Полинуклеотид по любому из пп.1-5, где последовательность, кодирующая трансмембранный домен, является кодон-оптимизированной.
7. Полинуклеотид по любому из пп.1-4, где трансмембранный домен происходит из CD28, альфа-цепи Т-клеточного рецептора, бета-цепи Т-клеточного рецептора, дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3дзета, CD3эпсилон, CD3гамма, CD3дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D, DAP10 или DAP12.
8. Полинуклеотид по п.7, где трансмембранный домен CD28 содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO:3.
9. Полинуклеотид по любому из пп.1-8, где CAR содержит два или более внутриклеточных домена.
10. Полинуклеотид по любому из пп.1-8, где CAR содержит три или более внутриклеточных домена.
11. Полинуклеотид по любому из пп.1-10, где внутриклеточный домен содержит CD3дзета.
12. Полинуклеотид по любому из пп.1-8, где внутриклеточный домен представляет собой внутриклеточный костимулирующий домен.
13. Полинуклеотид по п.9, где внутриклеточный домен содержит сигнальный домен, содержащий ITAM.
14. Полинуклеотид по п.9, где внутриклеточный костимулирующий домен выбран из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB, DAP12, NKG2D, OX-40 (CD134), DAP10, CD40L, 2B4, DNAM, CS1, CD48, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 и их комбинации.
15. Полинуклеотид по любому из пп.1-14, где внутриклеточный домен представляет собой костимулирующий домен.
16. Полинуклеотид по любому из пп.1-15, где сигнальный пептид получен из CD27 или рецептора колониестимулирующего гранулоцитарно-макрофагального фактора

(GMSCF-R).

17. Полинуклеотид по п.16, где последовательность сигнального пептида CD27 содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO:6.

18. Полинуклеотид по п.1, где сигнальный пептид происходит от CD27, анти-CD70 антигенсвязывающий домен происходит от CD27, трансмембранный домен происходит от CD27 и внутриклеточный домен происходит от CD27.

19. Полинуклеотид по любому из пп.1-18, где сигнальный пептид содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO:6.

20. Полинуклеотид по любому из пп.1-19, где CAR содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO:4.

21. Полинуклеотид по любому из пп.1-20, где трансмембранный домен содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:7.

22. Полинуклеотид по любому из пп.1-21, где внутриклеточный домен содержит одну или более из последовательностей SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12.

23. Полинуклеотид по любому из пп.1-22, где CAR содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO:5.

24. Полинуклеотид по любому из пп.1-23, где CAR содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO:1.

25. Полинуклеотид по любому из пп.2-24, где CAR содержит одно или более из следующего:

(a) сигнальный пептид CD27 (SP), внеклеточный домен CD27 (EC), трансмембранный домен CD27 (TMD), внутриклеточный домен DAP12 (ICD) и CD3дзета;

(b) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD, DAP12 ICD;

(c) CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD, DAP12 ICD и CD3дзета;

(d) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, DAP12 ICD и CD3дзета;

(e) CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD, член группы 2 натуральных киллеров D (NKG2D) ICD и CD3дзета;

(f) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD, NKG2D ICD и CD3дзета;

(g) CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD, член группы 2 натуральных киллеров D (NKG2D) ICD и CD3дзета;

(h) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, NKG2D ICD и CD3дзета;

(i) CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD, 4-1BB ICD и CD3дзета;

(j) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD, 4-1BB ICD и CD3дзета;

(k) CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD, 4-1BB ICD и CD3дзета;

- (l) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, 4-1BB ICD и CD3дзета;
- (m) CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD, DAP10 ICD и CD3дзета;
- (n) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD, DAP10 ICD и CD3дзета;
- (o) CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD, DAP10 ICD и CD3дзета;
- (p) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD, DAP10 ICD и CD3дзета;
- (q) CD27 SP, полноразмерный CD27 (FL), CD27 TMD, CD27 ICD и CD3дзета;
- (r) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 FL, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD и CD3дзета;
- (s) CD27 SP, CD27 FL, CD27 TMD, CD27 ICD, CD28 ICD и CD3дзета;
- (t) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 FL, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD, CD28 ICD и CD3дзета;
- (u) CD27 SP, CD27 FL, CD27 TMD, CD27 ICD, 4-1BB ICD и CD3дзета;
- (v) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 FL, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD, 4-1BB ICD и CD3дзета;
- (w) CD27 SP, CD27 FL, CD27 TMD, CD27 ICD, DAP10 ICD и CD3дзета;
- (x) GMSCF-R SP, CD27 FL, CD27 TMD, CD27 ICD, DAP10 ICD и CD3дзета;
- (y) CD27 SP, CD27 FL, CD27 TMD, CD27 ICD, DAP12 ICD и CD3дзета;
- (z) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 FL, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD, DAP12 ICD и CD3дзета;
- (aa) CD27 SP, CD27 FL, CD27 TMD, CD27 ICD, NKG2D ICD и CD3дзета;
- (bb) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 FL, кодон-оптимизированный CD27 TMD, кодон-оптимизированный CD27 ICD, NKG2D ICD и CD3дзета;
- (cc) CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD и CD3дзета;
- (dd) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD и CD3дзета;
- (ee) CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD и CD3дзета;
- (ff) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD28 TMD и CD3дзета;
- (gg) CD27 SP, CD27 EC, CD27 TMD, CD28 ICD и CD3дзета;
- (hh) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, кодон-оптимизированный CD27 TMD, CD28 ICD и CD3дзета;
- (ii) CD27 SP, CD27 EC, CD28 TMD, CD28 ICD и CD3дзета; или
- (jj) GMSCF-R SP, кодон-оптимизированный CD27 EC, CD28 TMD и CD3дзета.

26. Клетка, содержащая полинуклеотид по любому из пп.1-25.

27. Клетка по п.26, где клетка представляет собой иммунную клетку.

28. Иммунная клетка по п.27, где иммунная клетка представляет собой естественную клетку-киллер (NK), Т-клетку, гамма-дельта-Т-клетки, инвариантную NKT-клетку (iNKT),

В-клетку, макрофаг, MSC или дендритную клетку.

29. Иммунная клетка по пп.27 или 28, где клетка представляет собой НК-клетку.

30. Клетка по пп.28 или 29, где НК-клетка получена из пуповинной крови, периферической крови, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, костного мозга, из клеточной линии или их смеси.

31. Иммунная клетка по п.30, где линия НК-клеток представляет собой клеточную линию NK-92 или другую НК-клеточную линию, полученную из опухоли или здоровой НК-клетки, или является клеткой-предшественником.

32. Иммунная клетка по любому из пп.29-31, где НК-клетка получена из мононуклеарной клетки пуповинной крови.

33. Иммунная клетка по любому из пп.28-32, где НК-клетка представляет собой CD56+ НК-клетку.

34. Иммунная клетка по любому из пп.28-33, где НК-клетки экспрессируют один или более экзогенно введенных цитокинов.

35. Иммунная клетка по п.34, где цитокин представляет собой IL-15, IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, IL-7 или их комбинацию.

36. Популяция из иммунных клеток по любому из пп.27-35, где указанные клетки находятся в подходящей среде.

37. Популяция по п.36, где иммунные клетки представляют собой НК-клетки.

38. Способ киллинга CD70-положительных клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества клеток, содержащих полинуклеотид по любому из пп.1-25.

39. Способ по п.38, где клетки представляют собой НК-клетки, Т-клетки, гамма-дельта-Т-клетки, инвариантные НКТ-клетки (iNKT), В-клетки, макрофаги, гамма-дельта-Т-клетки или дендритные клетки.

40. Способ по п.39, где НК-клетки получены из пуповинной крови, периферической крови, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, костного мозга или из клеточной линии.

41. Способ по любому из пп.39 и 40, где НК-клетки получены из мононуклеарных клеток пуповинной крови.

42. Способ по любому из пп.38-41, где CD70-положительные клетки не являются опухолевыми клетками.

43. Способ по п.42, где CD70-положительные клетки представляют собой Т-регуляторные клетки.

44. Способ по любому из пп.28-41, где у субъекта имеется злокачественная опухоль, экспрессирующая CD70.

45. Способ по любому из пп.28-41, где у субъекта имеется острый миелоидный лейкоз, лимфома, рак легкого, почечно-клеточный рак, рак мочевого пузыря, меланома, глиобластома, рак молочной железы, рак головы и шеи, мезотелиома, множественная миелома, рак поджелудочной железы, или их комбинация.

46. Способ по любому из пп.28-45, где клетки являются аллогенными по отношению к субъекту.

47. Способ по любому из пп.28-45, где клетки являются аутологичными по отношению к субъекту.

48. Способ по любому из пп.28-47, где субъектом является человек.

49. Способ по любому из пп.28-48, где клетки вводят субъекту один или более раз.

50. Способ по п.49, где продолжительность времени между введениями клеток субъекту составляет 1-24 ч, 1-7 суток, 1-4 недели, 1-12 месяцев или один год или более.

51. Способ по любому из пп.28-50, дополнительно включающий стадию обеспечения субъекту эффективного количества дополнительной терапии.

52. Способ по п.51, где дополнительная терапия включает хирургическое вмешательство, лучевую терапию, генную терапию, иммунотерапию или гормональную терапию.

53. Способ по пп.51 или 52, где дополнительная терапия включает одно или более антител.

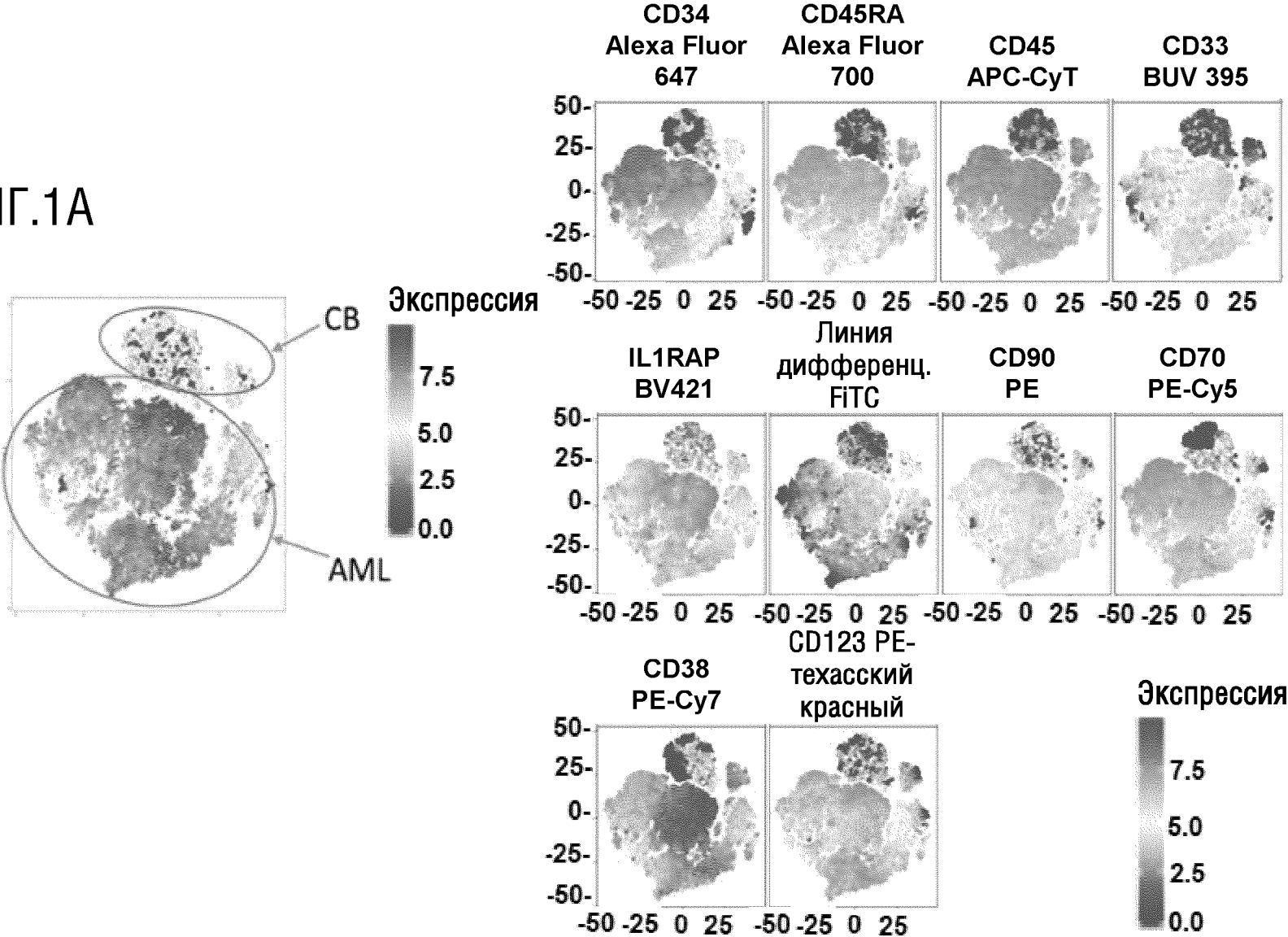
54. Способ по любому из пп.28-53, где клетки вводят субъекту путем инъекции, внутривенно, внутриартериально, внутривентрикулярно, интратрахеально, интратуморально, внутримышечно, эндоскопически, в очаг поражения, интракраниально, чрескожно, подкожно, регионарно, путем перфузии в микроокружении опухоли или их комбинации.

55. Способ по любому из пп.28-54, дополнительно включающий стадию идентификации CD70-положительных клеток у субъекта.

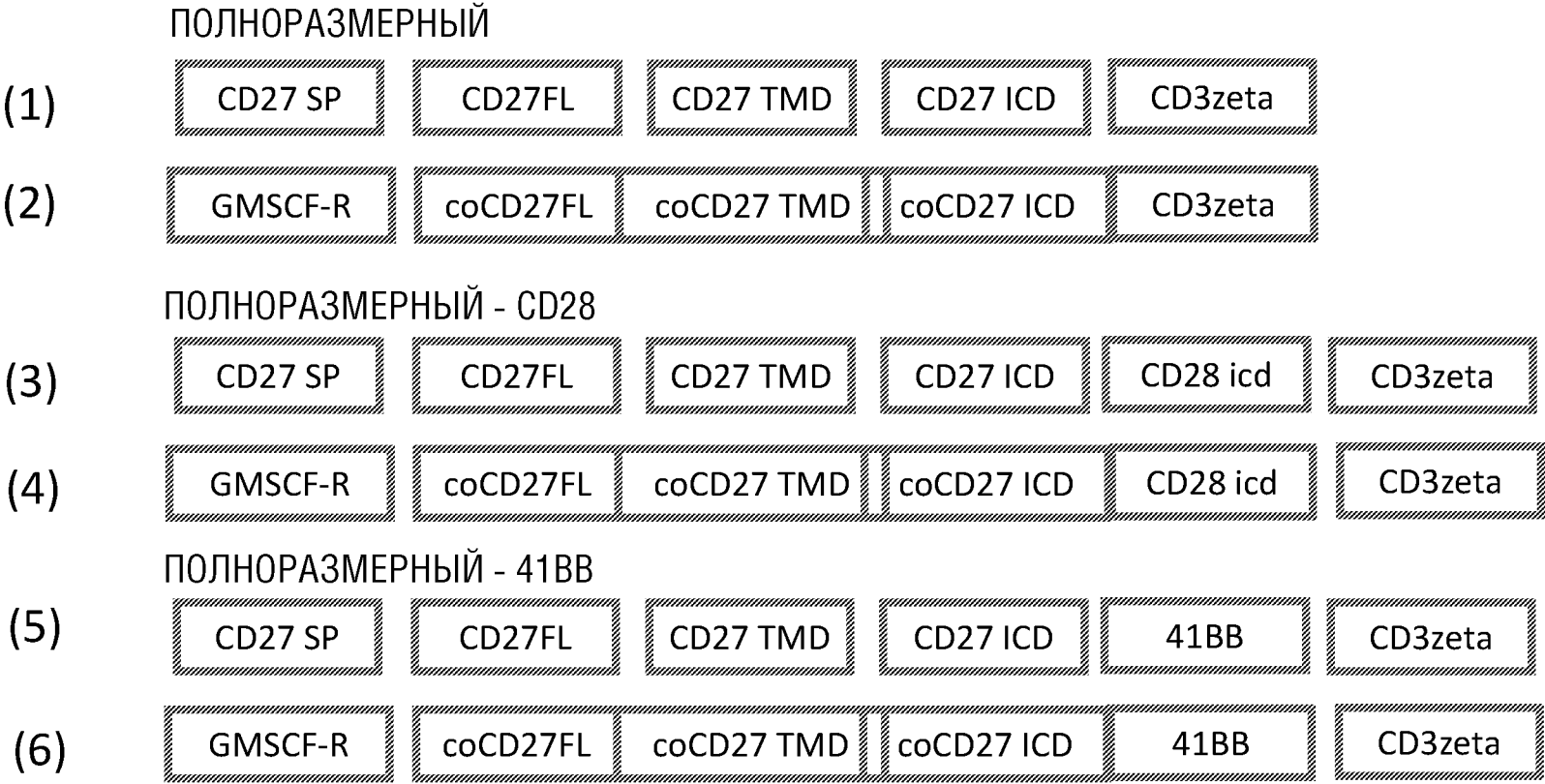


ФИГ.1В

ФИГ.1А



ФИГ.2А



ФИГ.2В

ПОЛНОРАЗМЕРНЫЙ - DAP10

|     |         |          |            |            |       |         |
|-----|---------|----------|------------|------------|-------|---------|
| (7) | CD27 SP | CD27FL   | CD27 TMD   | CD27 ICD   | DAP10 | CD3zeta |
| (8) | GMSCF-R | coCD27FL | coCD27 TMD | coCD27 ICD | DAP10 | CD3zeta |

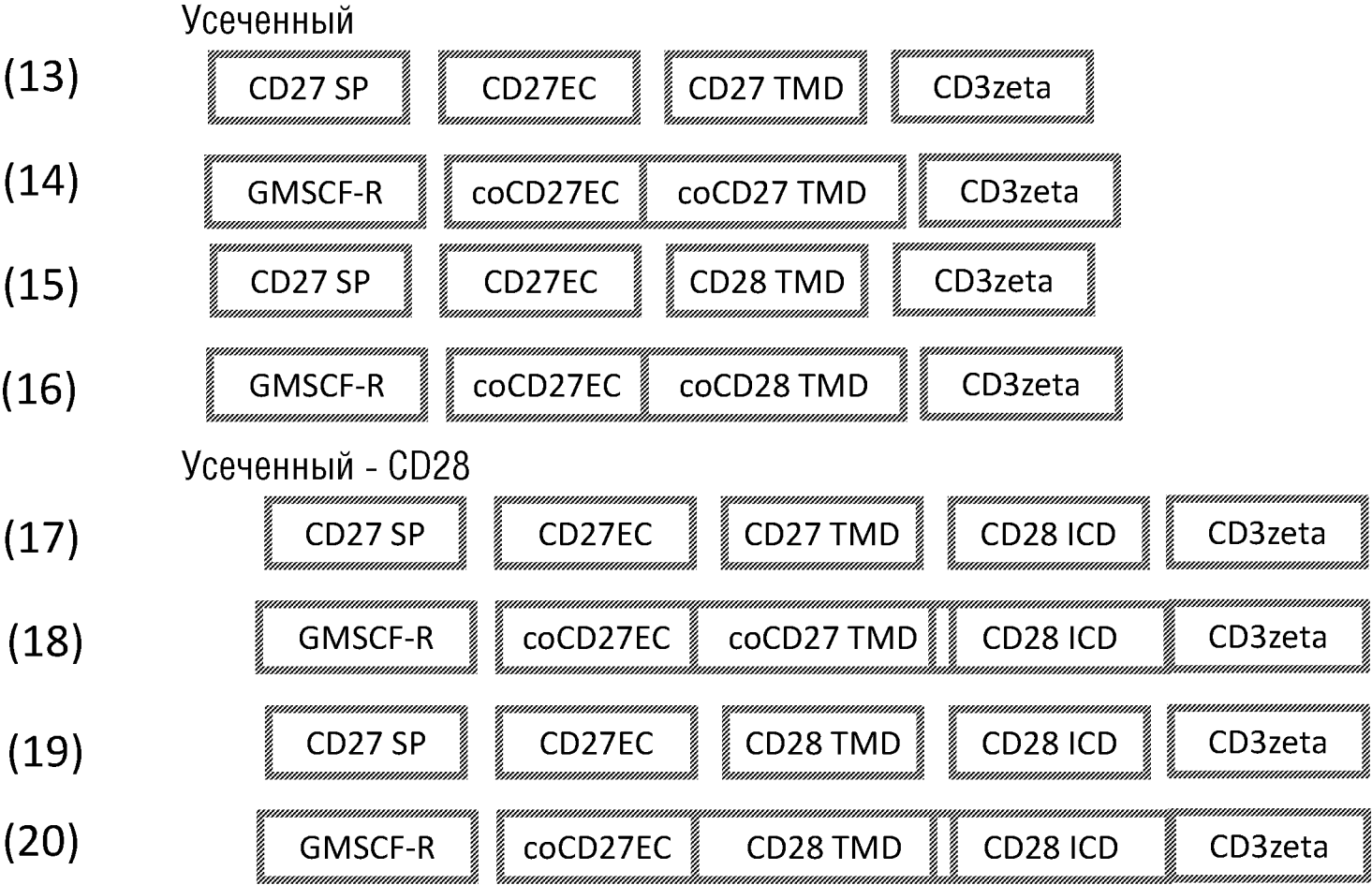
ПОЛНОРАЗМЕРНЫЙ - DAP12

|      |         |          |            |            |       |         |
|------|---------|----------|------------|------------|-------|---------|
| (9)  | CD27 SP | CD27FL   | CD27 TMD   | CD27 ICD   | DAP12 | CD3zeta |
| (10) | GMSCF-R | coCD27FL | coCD27 TMD | coCD27 ICD | DAP12 | CD3zeta |

ПОЛНОРАЗМЕРНЫЙ - NKG2D

|      |         |          |            |            |       |         |
|------|---------|----------|------------|------------|-------|---------|
| (11) | CD27 SP | CD27FL   | CD27 TMD   | CD27 ICD   | NKG2D | CD3zeta |
| (12) | GMSCF-R | coCD27FL | coCD27 TMD | coCD27 ICD | NKG2D | CD3zeta |

ФИГ.2С



ФИГ.2D

Усеченный - 41BB

|      |         |          |            |      |         |
|------|---------|----------|------------|------|---------|
| (21) | CD27 SP | CD27EC   | CD27 TMD   | 41BB | CD3zeta |
| (22) | GMSCF-R | coCD27EC | coCD27 TMD | 41BB | CD3zeta |
| (23) | CD27 SP | CD27EC   | CD28 TMD   | 41BB | CD3zeta |
| (24) | GMSCF-R | coCD27EC | CD28 TMD   | 41BB | CD3zeta |

Усеченный - DAP10

|      |         |          |            |       |         |
|------|---------|----------|------------|-------|---------|
| (25) | CD27 SP | CD27EC   | CD27 TMD   | DAP10 | CD3zeta |
| (26) | GMSCF-R | coCD27EC | coCD27 TMD | DAP10 | CD3zeta |
| (27) | CD27 SP | CD27EC   | CD28 TMD   | DAP10 | CD3zeta |
| (28) | GMSCF-R | coCD27EC | CD28 TMD   | DAP10 | CD3zeta |

ФИГ.2Е

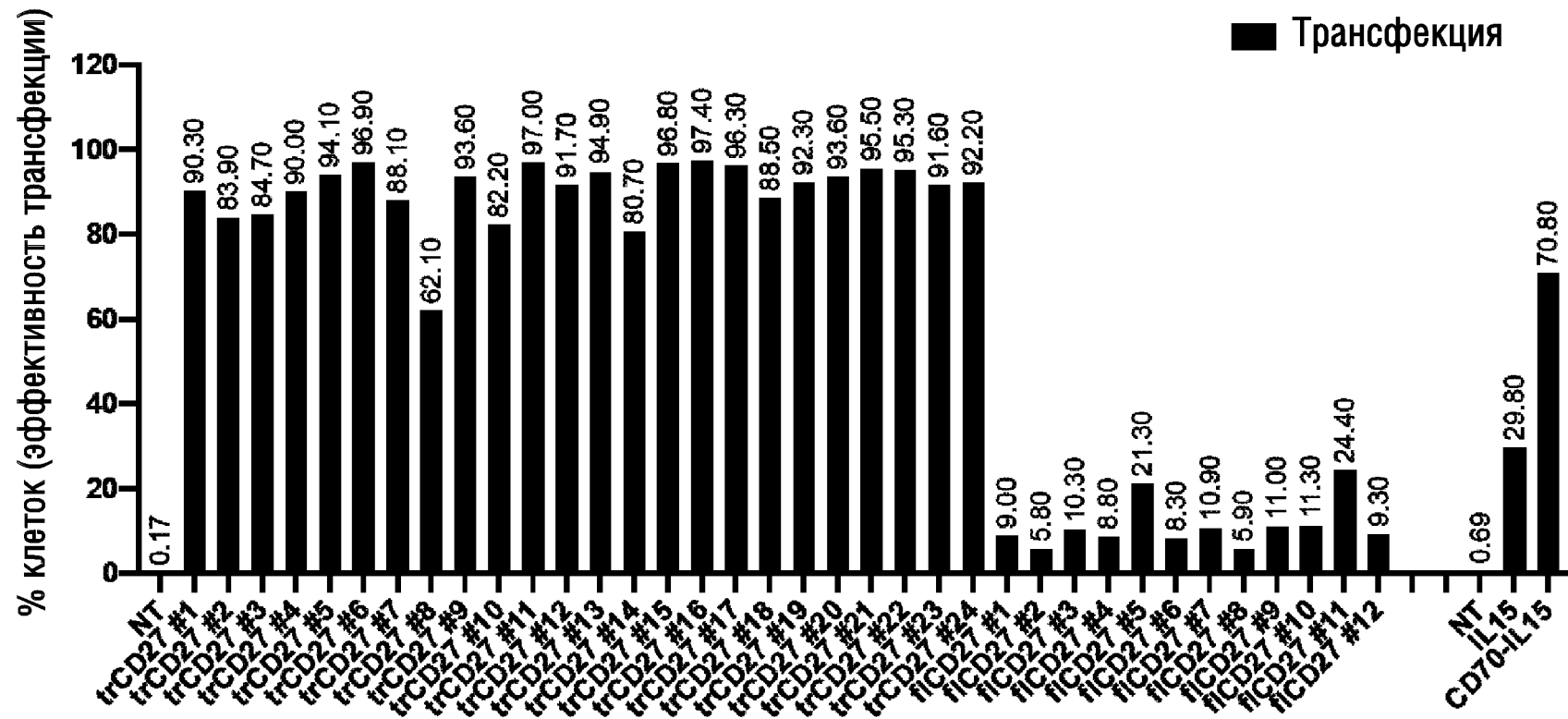
Усеченный - DAP12

|      |         |          |            |       |         |
|------|---------|----------|------------|-------|---------|
| (29) | CD27 SP | CD27EC   | CD27 TMD   | DAP12 | CD3zeta |
| (30) | GMSCF-R | coCD27EC | coCD27 TMD | DAP12 | CD3zeta |
| (31) | CD27 SP | CD27EC   | CD28 TMD   | DAP12 | CD3zeta |
| (32) | GMSCF-R | coCD27EC | CD28 TMD   | DAP12 | CD3zeta |

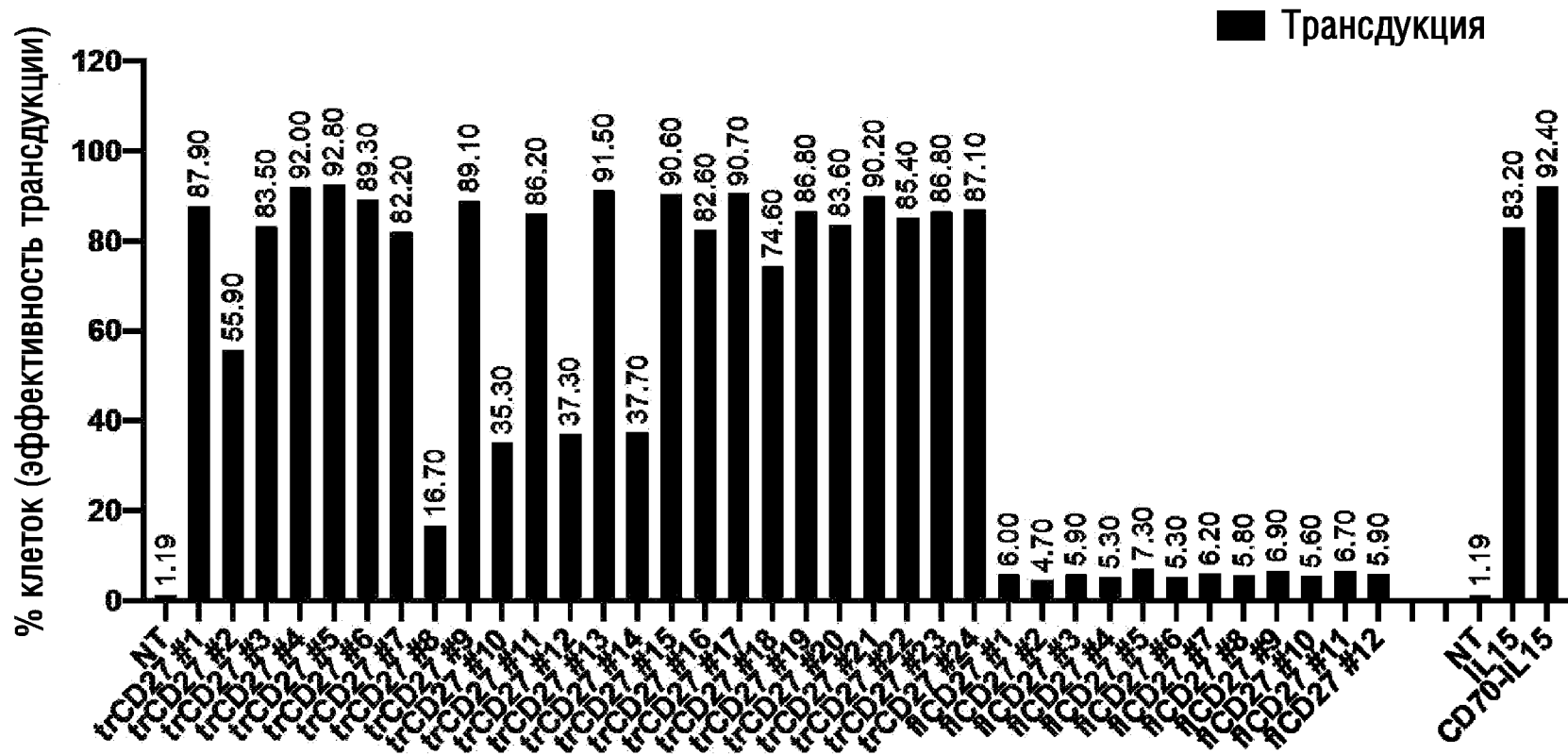
Усеченный - NKG2D

|      |         |          |            |       |         |
|------|---------|----------|------------|-------|---------|
| (33) | CD27 SP | CD27EC   | CD27 TMD   | NKG2D | CD3zeta |
| (34) | GMSCF-R | coCD27EC | coCD27 TMD | NKG2D | CD3zeta |
| (35) | CD27 SP | CD27Ec   | CD28 TMD   | NKG2D | CD3zeta |
| (36) | GMSCF-R | coCD27EC | CD28 TMD   | NKG2D | CD3zeta |

ФИГ.3

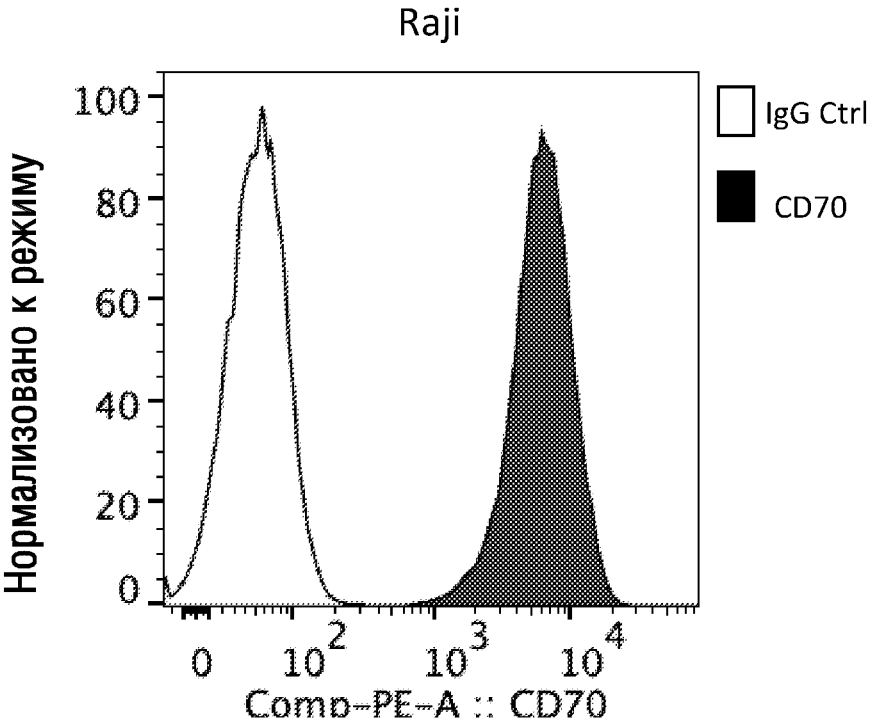


ФИГ.4

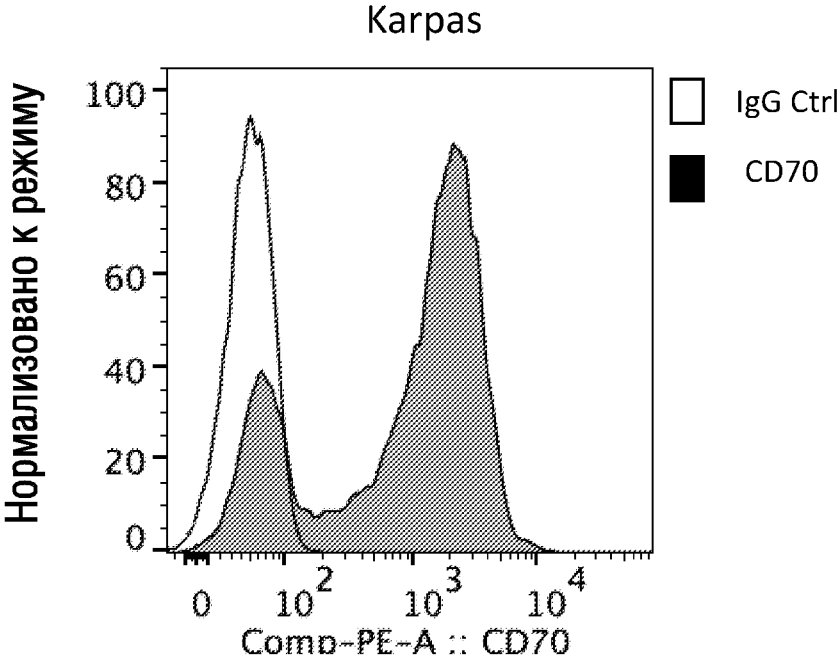




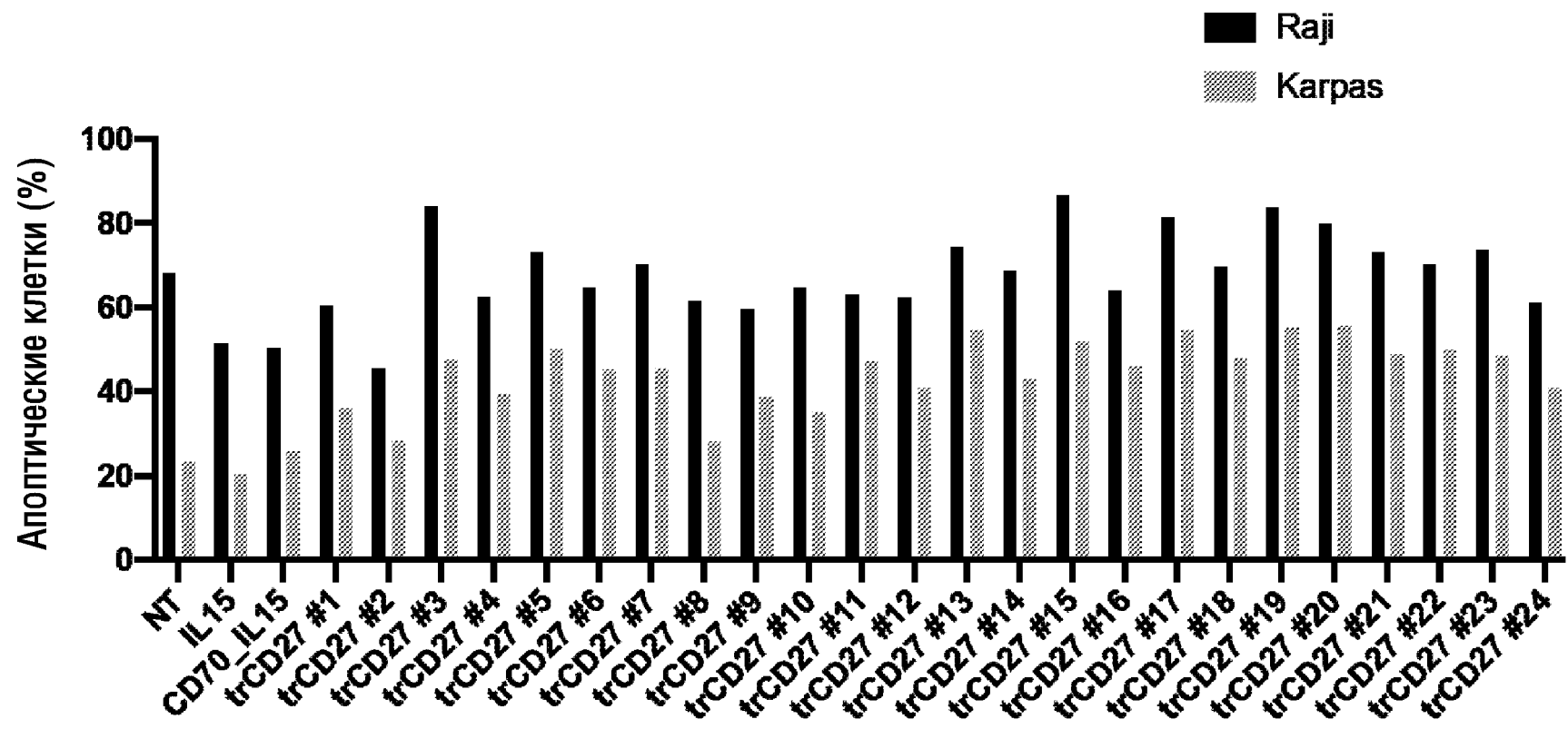
ФИГ.5А



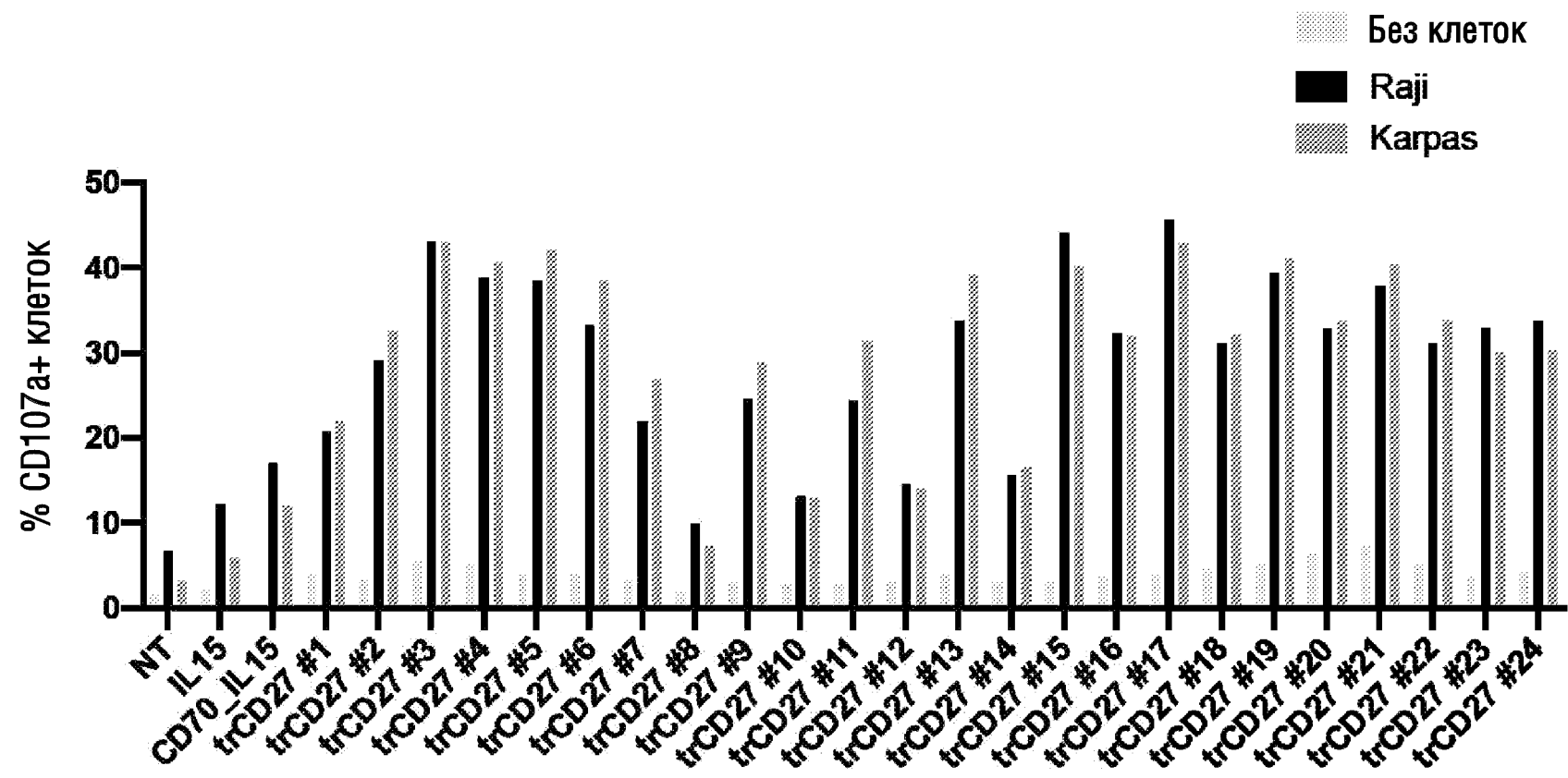
ФИГ.5В



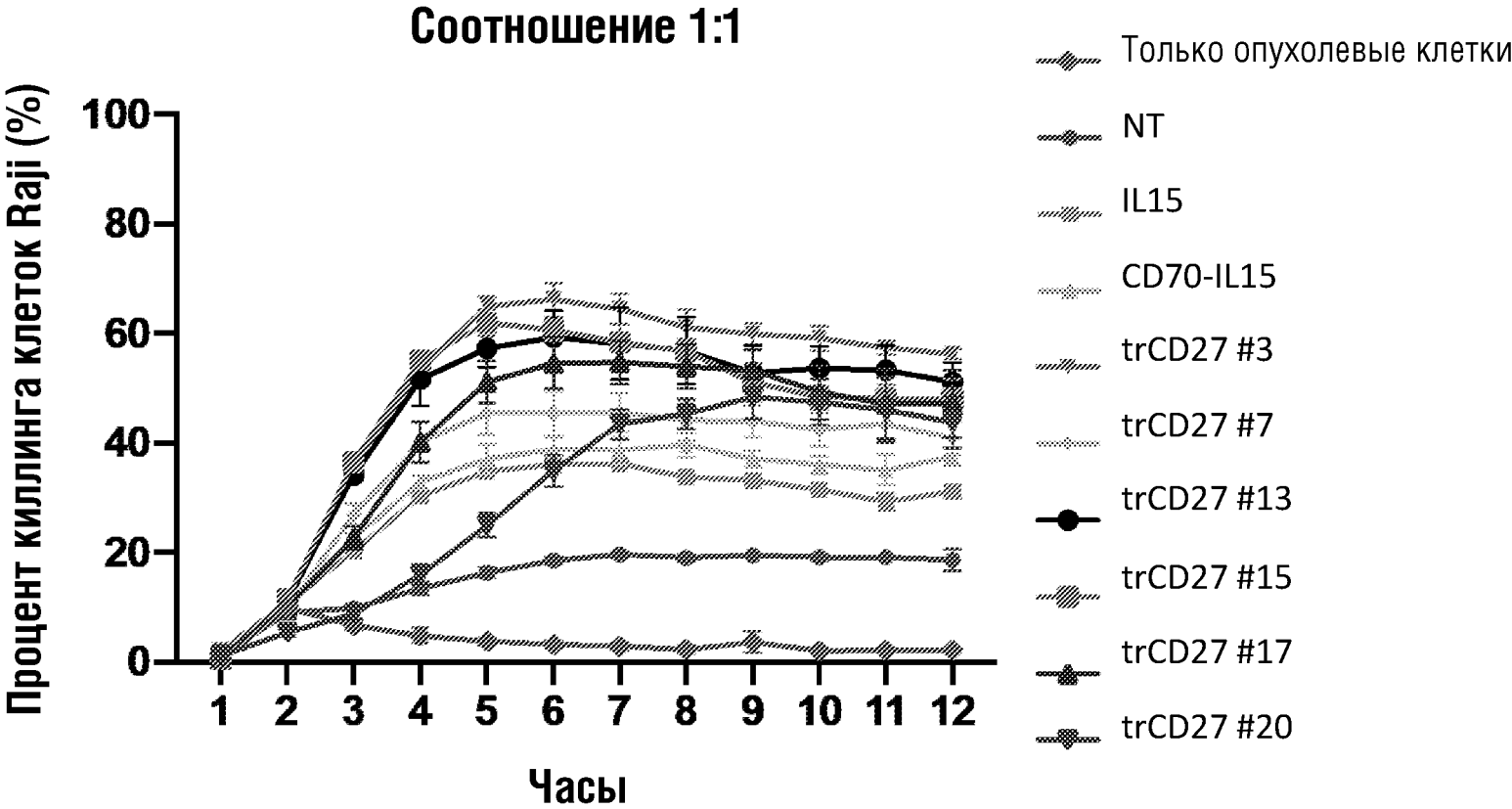
ФИГ.5С



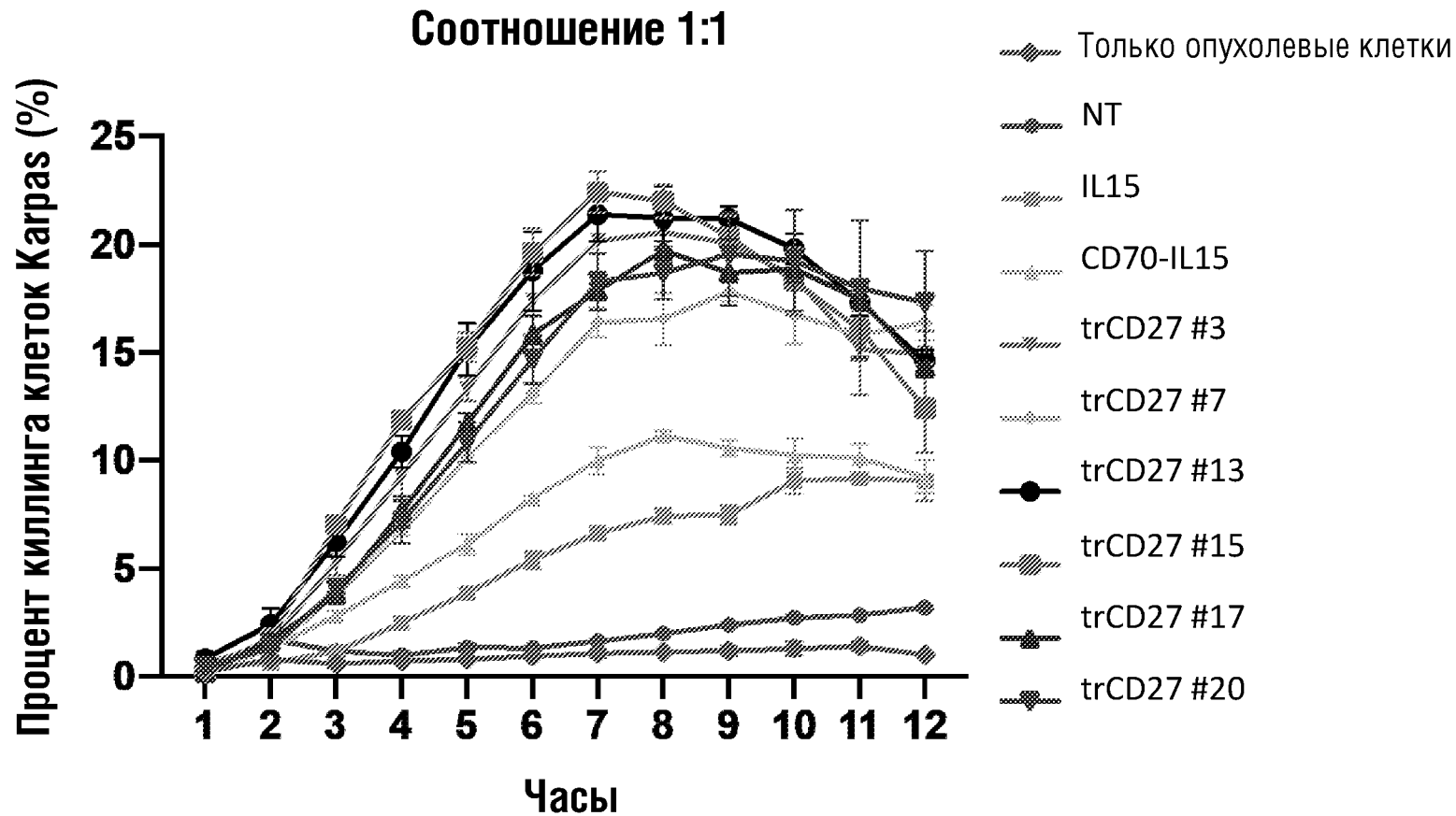
ФИГ.6



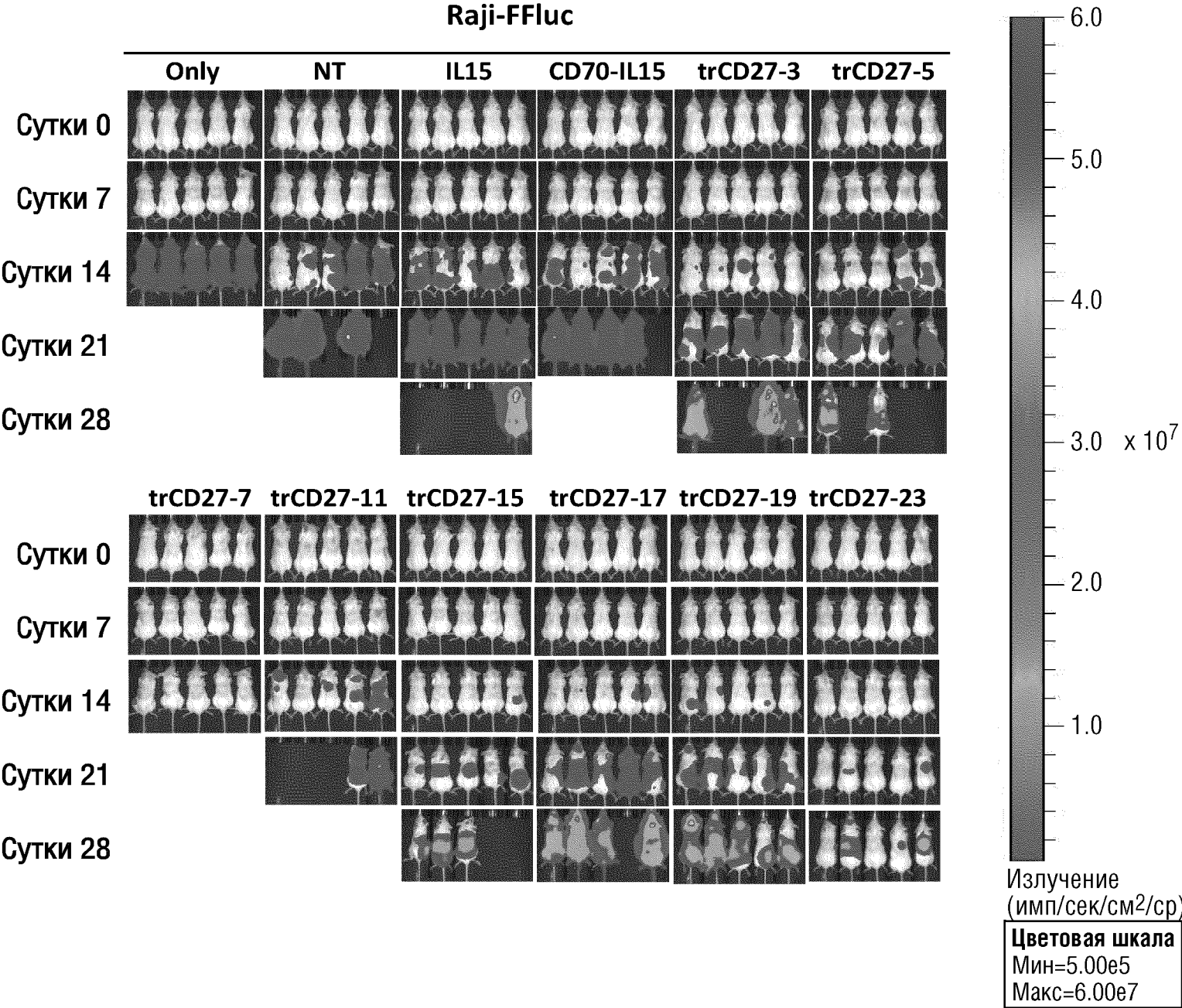
ФИГ.7А



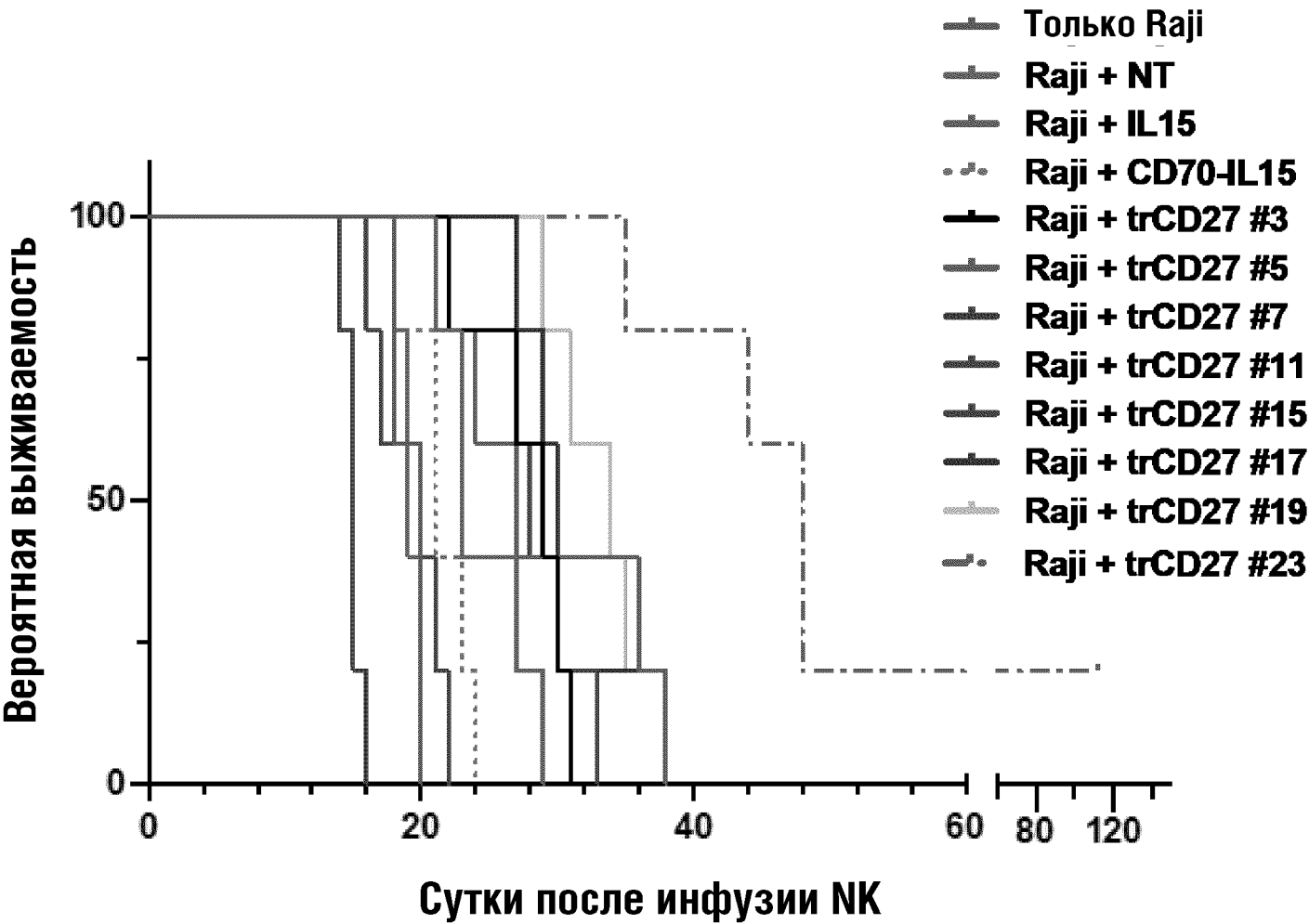
ФИГ.7В



ФИГ.8А



ФИГ.8В





ФИГ.9А



ФИГ.9В

