

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202191058 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.10.07

(51) Int. Cl. C07K 16/30 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
C07K 14/47 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.11.14

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ МУЦИНА-16 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/768,730

(72) Изобретатель:

(32) 2018.11.16

Сприггс Дэвид, Моралес Хавьер,  
Накано Йоко, Лю Хун (US)

(33) US

(86) PCT/US2019/061503

(74) Представитель:

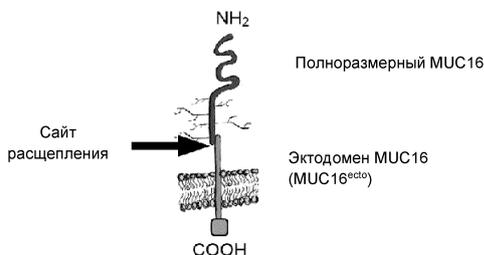
(87) WO 2020/102555 2020.05.22

Нилова М.И. (RU)

(71) Заявитель:

МЕМОРИАЛ СЛОУН КЕТТЕРИНГ  
КЭНСЕР СЕНТР; ЭВРИКА  
ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(57) В изобретении предложены композиции, способы и применения, включающие агенты, специфичные к муцину-16 (MUC16), иммуноспецифически связывающие эпитоп муцина-16 (MUC16). Также в настоящем изобретении предложены применения и способы контроля, лечения или предупреждения расстройств, таких как рак и заболевания, связанные с положительной экспрессией MUC16.



A1

202191058

202191058

A1

# АНТИТЕЛА ПРОТИВ МУЦИНА-16 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

## ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

**[0001]** Настоящая заявка испрашивает преимущество и приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/768730, поданной 16 ноября 2018 года, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

## ЗАЯВЛЕНИЕ О ГОСУДАРСТВЕННОЙ ПОДДЕРЖКЕ

**[0002]** Данное изобретение было создано при поддержке правительства в соответствии с СА190174, присужденным Национальными институтами здравоохранения. Правительство обладает определенными правами на это изобретение.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[0002.1]** Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и, таким образом, полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 23 декабря 2019 г., называется 115872-0494\_SL.txt и имеет размер 299 423 байта.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0003]** Муцины являются важными биомолекулами для клеточного гомеостаза и защиты эпителиальных поверхностей. Изменения в экспрессии муцинов при раковых заболеваниях, таких как рак яичника, являются подходящим биомаркером для диагностики, прогнозирования и лечения (Singh AP, *et al.*, *Lancet Oncol* 2008; 9(11): 1076-85). MUC16 представляет собой муцин, который сверхэкспрессируется на

большинстве клеток карциномы яичника и является признанным суррогатным сывороточным маркером (CA-125) для обнаружения и прогрессирования раковых заболеваний яичника (Badgwell D, *et al.*, *Dis Markers* 23(5-6):397410 (2007); Bast RC, Jr, *et al.*, *Int J Gynecol Cancer* 15 Suppl 3:274-81 (2005); Fritsche HA, *et al.*, *Clin Chem* 44(7): 1379-80 (1998); и Krivak TC *et al.*, *Gynecol Oncol* 115(1):81-5 (2009)).

**[0004]** MUC16 представляет собой высокогликозилированный муцин, состоящий из большого внеклеточного домена (CA-125), который отщепляется и высвобождается, и сохраненного домена (MUC-CD) (фиг. 1). MUC-CD содержит не содержащий повторов внеклеточный домен (эктодомен MUC16) вблизи сайта расщепления, трансмембранный домен и цитоплазматический хвост с потенциальными сайтами фосфорилирования. Расположенный дистально относительно сайта расщепления, высвобождаемый внеклеточный домен (CA-125) содержит 16–20 tandemных повторов из 156 аминокислот, каждый из которых имеет множество потенциальных сайтов гликозилирования (O'Brien TJ, *et al.*, *Tumor Biol* 22(6):348-66 (2001)). Поскольку антиген MUC16 в противном случае экспрессируется только на низких уровнях в нормальных тканях матки, эндометрия, фаллопиевых труб, яичников и серозной оболочки брюшной и грудной полостей, MUC16 является потенциально привлекательной мишенью для иммунной терапии, включая нацеливание на рак и его лечение.

**[0005]** Значительная часть внеклеточного домена MUC16 отщепляется и секретируется (т. е. CA-125), что ограничивает пригодность этой части MUC16 для использования в качестве антигена-мишени при карциномах яичника. Многие зарегистрированные моноклональные антитела к MUC16 связываются с эпитопами, присутствующими на большой секретируемой фракции CA-125 гликопротеина, а не с сохраненным эктодоменом MUC16 (Bellone S *Am J Obstet Gynecol* 200(1):75 e1-10 (2009), Berek JS. *Expert Opin Biol Ther.* 4(7): 1159-65 (2004); O'Brien TJ, *et al.*, *Int J Biol Markers* 13(4): 188-95 (1998)). Таким образом, для диагностических и терапевтических целей необходимо получение новых антител к области MUC16, которая не слушивается.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0006]** В настоящем документе предложены композиции, способы и применения конструкций связывающих муцин-16 (MUC16), которые содержат компоненты антител, иммуноспецифически связывающиеся с муцином-16 (MUC16) и модулирующие экспрессию и/или активность MUC16 для контроля или лечения MUC16-опосредованных расстройств, таких как рак.

**[0007]** В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложены конструкции, связывающие муцина-16 (MUC16), содержащие компонент антитела, иммуноспецифически распознающий полипептид муцина-16 (MUC16), где указанный компонент антитела содержит (a)(i) переменную тяжелую (VH) цепь, содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (НС-CDR) 1, НС-CDR2 и НС-CDR3 переменного домена тяжелой цепи с SEQ ID NO: 2; и (ii) переменную легкую (VL) цепь, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (LC-CDR) 1, LC-CDR2 и LC-CDR3 переменного домена легкой цепи с SEQ ID NO: 3; или (b)(i) переменную тяжелую (VH) цепь, содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (НС-CDR) 1, НС-CDR2 и НС-CDR3 переменного домена тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10; и (ii) переменную легкую (VL) цепь, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (LC-CDR) 1, LC-CDR2 и LC-CDR3 переменного домена легкой цепи с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела иммуноспецифически распознает человеческий MUC16. В некоторых вариантах осуществления MUC16 является гликозилированным. В некоторых вариантах осуществления MUC16 является N-гликозилированным по Asn1800 или Asn1806.

**[0008]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела конструкций, связывающих муцин-16 (MUC16), предложенных в настоящем документе, содержит (a)(i) переменную тяжелую (VH) цепь, содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (НС-CDR) 1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; НС-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и НС-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и (ii) переменную легкую (VL) цепь, содержащую: определяющую комплементарность область легкой цепи (LC-CDR) 1,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; или (b)(i) переменную тяжелую (VH) цепь, содержащую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и (ii) переменную легкую (VL) цепь, содержащую: LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

**[0009]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела конструкций, связывающих муцин-16 (MUC16), предложенных в настоящем документе, иммуноспецифически связывается с эктодоменом MUC16. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела представляет собой полноразмерное антитело, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv или одноцепочечный Fv (scFv). В некоторых вариантах осуществления VH-цепь и VL-цепь представляют собой человеческие VH-цепь и VL-цепь. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела иммуноспецифически связывается с полипептидом MUC16 c114, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления конструкции, связывающие MUC16, предложенные в настоящем документе, ингибируют инвазию *in vitro* опухолевой клетки, экспрессирующей MUC16, в анализе инвазии в Matrigel. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка представляет собой клетку опухоли яичника.

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела конструкций, связывающих муцин-16 (MUC16), предложенных в настоящем документе, содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела содержит VH, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела содержит константные области тяжелой и легкой цепи, полученные от человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из гамма-1, гамма-2, гамма-3 и гамма-4. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из каппа и лямбда. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела представляет собой иммуноглобулин, содержащий две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулин представляет собой IgG.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления конструкция, связывающая MUC16, предложенная в настоящем документе, является моноспецифичной. В некоторых вариантах осуществления конструкция, связывающая MUC16, предложенная в настоящем документе, является мультиспецифичной. В некоторых вариантах осуществления конструкция, связывающая MUC16, предложенная в настоящем документе, является биспецифичной. В некоторых вариантах осуществления конструкция, связывающая MUC16, предложенная в настоящем документе, представляет собой тандемный scFv, диатело (Db), одноцепочечное диатело (scDb), перенацеливающее антитело с двойной аффинностью (DART), F(ab')<sub>2</sub>, антитело с двумя переменными доменами (DVD), антитело типа «выступ-во-впадину» (KiH), антитело типа «замок на причале» («dock-and-lock», DNL), химически сшитое антитело, гетеромультимерное антитело или гетероконъюгатное антитело. В некоторых вариантах осуществления конструкция, связывающая MUC16, предложенная в настоящем документе, представляет собой тандемный scFv, содержащий два scFv, связанные пептидным линкером. В некоторых вариантах

осуществления компонент антитела, иммуноспецифически распознающий MUC16, представляет собой первый компонент антитела, и при этом конструкция, связывающая MUC16, дополнительно содержит второй компонент антитела, иммуноспецифически распознающий второй антиген. В некоторых вариантах осуществления второй антиген представляет собой антиген на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления второй антиген представляет собой CD3. В некоторых вариантах осуществления второй антиген выбран из группы, состоящей из CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  и CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления второй антиген представляет собой CD3 $\epsilon$ .

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления конструкция, связывающая MUC16, предложенная в настоящем документе, представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления CAR содержит костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит цитоплазматический сигнальный домен дзета ( $\zeta$ )-цепи CD3.

**[0014]** В некоторых вариантах осуществления конструкция, связывающая MUC16, предложенная в настоящем документе, дополнительно конъюгирована с пептидным агентом, детектирующим агентом, визуализирующим агентом, терапевтическим агентом или цитотоксическим агентом.

**[0015]** В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления также предложены полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность согласно одной или более из SEQ ID NO: 2-17 или аминокислоту конструкции, связывающие MUC16, предложенной в настоящем документе.

**[0016]** В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления также предложены полинуклеотиды, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более полипептидов, содержащих аминокислотную последовательность согласно одной или более из SEQ ID NO: 2-17 или аминокислоту конструкции, связывающие MUC16, предложенной в настоящем документе. В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления предложены векторы, содержащие полинуклеотид, предложенный в настоящем документе, функционально связанный с промотором.

**[0017]** В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления также предложены клетки, содержащие конструкцию, связывающую MUC16, предложенную в настоящем документе, полипептид, предложенный в настоящем документе, полинуклеотид, предложенный в настоящем документе, или вектор, предложенный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку или В-клетку.

**[0018]** В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления также предложены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество конструкции, связывающие MUC16, предложенной в настоящем документе, полипептида, предложенного в настоящем документе, полинуклеотида, предложенного в настоящем документе, или вектора, предложенного в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

**[0019]** В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления также предложены способы лечения связанного с MUC16 заболевания или расстройства у нуждающегося в этом пациента, включающие введение указанному пациенту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество конструкции, связывающие MUC16, предложенной в настоящем документе, полипептида, предложенного в настоящем документе, полинуклеотида, предложенного в настоящем документе, или вектора, предложенного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления связанное с MUC16 заболевание или расстройство представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак яичника, легкого, поджелудочной железы, молочной железы, матки, фаллопиевой трубы или первичный рак брюшины. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой метастатический рак. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция ингибирует метастазирование у пациента. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой человека.

**[0020]** В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления также предложены способы получения эффекторной клетки, включающие генетическую модификацию клетки одной или более нуклеиновыми кислотами, кодирующими конструкцию, связывающую MUC16, предложенную в настоящем документе.

**[0021]** В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления также предложены способы, включающие введение одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих конструкцию, связывающую MUC16, предложенную в настоящем документе, в одну или более первичных клеток, выделенных от пациента, и введение клеток, содержащих указанные одну или более нуклеиновых кислот, указанному пациенту. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает размножение клеток до введения клеток пациенту. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки представляют собой лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления первичные клетки представляют собой Т-клетки.

**[0022]** В некоторых вариантах осуществления способы лечения, предложенные в настоящем документе, дополнительно включают введение пациенту терапевтически эффективного количества дополнительного терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой противораковое средство. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент.

**[0023]** В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления также предложены способы обнаружения MUC16 в образце, включающие: (а) приведение образца в контакт с конструкцией, связывающей MUC16, предложенной в настоящем документе; и (б) детектирование связывания, непосредственное или опосредованное, между конструкцией, связывающей MUC16 и MUC16, присутствующим в образце. В некоторых вариантах осуществления конструкция, связывающая MUC16 конъюгирована с детектируемой меткой. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка представляет собой хромогенный, ферментный, радиоизотопный, изотопный, флуоресцентный, токсичный, хемилюминесцентный агент, контрастный агент для ядерного магнитного резонанса. В некоторых вариантах осуществления связывание между конструкцией, связывающей MUC16 и любым MUC16 в образце обнаруживают непосредственно путем обнаружения детектируемой метки. В

некоторых вариантах осуществления связывание между конструкцией, связывающей MUC16 и любым MUC16 в образце обнаруживают опосредованно с использованием вторичного антитела.

**[0024]** В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления также предложены способы диагностики индивидуума с подозрением на наличие связанного с MUC16 заболевания или расстройства, включающие а) введение эффективного количества конструкции, связывающей MUC16, предложенной в настоящем документе, указанному индивидууму; и б) определение уровня связывания, непосредственно или опосредованно, между конструкцией, связывающей MUC16 и любым MUC16 у указанного индивидуума, где уровень связывания выше порогового уровня указывает на то, что указанный индивидуум имеет связанное с MUC16 заболевание или расстройство. В некоторых вариантах осуществления конструкция, связывающая MUC16, конъюгирована с детектируемой меткой. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка представляет собой хромогенный, ферментный, радиоизотопный, изотопный, флуоресцентный, токсичный, хемилюминесцентный агент, контрастный агент для ядерного магнитного резонанса. В некоторых вариантах осуществления связывание между конструкцией, связывающей MUC16 и любым MUC16 в образце обнаруживают непосредственно путем обнаружения детектируемой метки. В некоторых вариантах осуществления связывание между конструкцией, связывающей MUC16 и любым MUC16 в образце обнаруживают опосредованно с использованием вторичного антитела.

**[0025]** Способ диагностики индивидуума с подозрением на наличие связанного с MUC16 заболевания или расстройства, включающий а) приведение образца, содержащего клетки, полученные от указанного индивидуума, в контакт с конструкцией, связывающей MUC16, предложенной в настоящем документе; и б) определение количества клеток в образце, связанных с конструкцией, связывающей MUC16, где значение количества клеток, связанных с конструкцией, связывающей MUC16, выше порогового уровня свидетельствует о том, что указанный индивидуум имеет связанное с MUC16 заболевание или расстройство. В некоторых вариантах осуществления конструкция, связывающая MUC16, конъюгирована с детектируемой меткой. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка представляет

собой хромогенный, ферментный, радиоизотопный, изотопный, флуоресцентный, токсичный, хемилюминесцентный агент, контрастный агент для ядерного магнитного резонанса. В некоторых вариантах осуществления связывание между конструкцией, связывающей MUC16 и любым MUC16 в образце обнаруживают непосредственно путем обнаружения детектируемой метки. В некоторых вариантах осуществления связывание между конструкцией, связывающей MUC16 и любым MUC16 в образце обнаруживают опосредованно с использованием вторичного антитела.

**[0026]** В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления также предложены способы получения конструкции, связывающей MUC16, иммуноспецифически связывающейся с полипептидом человеческого MUC16, включающие выбор человеческого scFv, специфичного к человеческому MUC16, из библиотеки фагового дисплея человеческих scFv-антител. В некоторых вариантах осуществления выбор человеческого scFv, специфичного к человеческому MUC16, включает приведение библиотеки фагового дисплея человеческих scFv-антител в контакт с клеткой, экспрессирующей рекомбинантный полипептид MUC16. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид MUC16 содержит последовательность SEQ ID NO: 25.

**[0027]** В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления также предложены применения конструкций, связывающих MUC16, полипептидов против MUC16, полинуклеотидов, кодирующих конструкции, связывающие MUC16 или полипептиды против MUC16, векторов, содержащих указанные полинуклеотиды, или клеток, содержащих любые из указанных полипептидов и их полинуклеотидов, предложенных в настоящем документе, для лечения заболевания или расстройства, связанного с положительной экспрессией MUC16. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство, связанное с положительной экспрессией MUC16, представляет собой рак.

**[0028]** В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления также предложены применения конструкций, связывающих MUC16, полипептидов, связывающих MUC16, полинуклеотидов, кодирующих конструкции, связывающие MUC16 или полипептиды против MUC16, векторов, содержащих указанные полинуклеотиды, или клеток, содержащих любые из указанных полипептидов и их

полинуклеотидов, предложенных в настоящем документе, для производства лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с положительной экспрессией MUC16. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство, связанное с положительной экспрессией MUC16, представляет собой рак.

**[0029]** В настоящем документе в отдельных вариантах осуществления также предложены применения конструкций, связывающих MUC16, полипептидов, связывающих MUC16, полинуклеотидов, кодирующих конструкции, связывающие MUC16 или полипептиды, связывающие MUC16, векторов, содержащих указанные полинуклеотиды, или клеток, содержащих любые из указанных полипептидов и их полинуклеотидов, предложенных в настоящем документе, для диагностики заболевания или расстройства, связанного с положительной экспрессией MUC16. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство, связанное с положительной экспрессией MUC16, представляет собой рак.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0030]** На **ФИГ. 1А** приведена схематическая иллюстрация структуры MUC16. На **ФИГ. 1В** приведена схема и аминокислотная последовательность усеченной формы MUC16, называемой MUC16 c114 (SEQ ID NO: 25), которая включает эктодомен из 58 аминокислот, трансмембранный домен из 25 аминокислот и цитоплазматический хвост из 31 аминокислоты. Нумерация на фигуре основана на оригинальной публикации, в которой идентифицируются Muc16, Yin and Lloyd (2001) J Biol Chem 276: 27371–27375.

**[0031]** На **ФИГ. 2** показано выравнивание аминокислотных последовательностей эктодоменов MUC16-C114 дикого типа (SEQ ID NO: 25) и N30-мутантного MUC16-C114 (SEQ ID NO: 31).

**[0032]** На **ФИГ. 3** проиллюстрирован анализ методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) экспрессии GFP в стабильных клеточных линиях HEK293, экспрессирующих MUC16-C114 дикого типа (HEK293-MUC16WT) или N30-мутантный MUC16-C114 (HEK293-MUC16mut). Контрольные клетки HEK293 показаны для сравнения.

[0033] На **ФИГ. 4** приведены результаты FACS-анализа клеток с MUC16-C114 дикого типа (HEK293-MUC16WT) или N30-мутантным MUC16-C114 (HEK293-MUC16mut), инкубированных с фагом отрицательного контроля и контролем без фага для всех трех клеточных линий.

[0034] На **ФИГ. 5** приведены иллюстративные результаты FACS-анализа клеток с MUC16-C114 дикого типа (HEK293-MUC16WT) или N30-мутантным MUC16-C114 (HEK293-MUC16mut), инкубированных с двумя иллюстративными фаговыми клонами антител, клоном 8 и клоном 12. Клоны антител, которые связывались с MUC16-C114 дикого типа, а не N30-мутантным MUC16-C114, были отобраны для секвенирования и дальнейшей разработки.

[0035] На **ФИГ. 6** показано связывание клона 8 биспецифического антитела (BsAb), содержащего scFv против MUC16 на N-конце и scFv против человеческого CD3ε из мышиного моноклонального антитела на C-конце, с клеточной линией MUC16<sup>+</sup> OVCAR3, но не с контрольной клеточной линией MUC16<sup>-</sup> SKOV3.

[0036] На **ФИГ. 7** приведены иллюстративные результаты анализа клеточной цитотоксичности с использованием отобранных BsAb против MUC16, включая клон 8 BsAb против MUC16 и клон 12 BsAb против MUC16, инкубированных с клеточной линией MUC16<sup>+</sup> OVCAR3 по сравнению с клеточной линией MUC16<sup>-</sup> SKOV3. Клон 8 и клон 12 BsAb были способны индуцировать мишень-специфический клеточный лизис клеточной линии MUC16<sup>+</sup> OVCAR3 по сравнению с клеточной линией MUC16<sup>-</sup> SKOV3.

[0037] На **ФИГ. 8** приведены иллюстративные результаты анализа клеточной цитотоксичности с использованием отобранных BsAb против MUC16, включая клон 8 BsAb против MUC16 и клон 12 BsAb против MUC16, инкубированных с клеточной линией MUC16<sup>+</sup> OVCAR3, клеточной линией MUC16<sup>+</sup> SKOV8 и клеточной линией MUC16<sup>+</sup> OVCA432 по сравнению с клеточной линией MUC16<sup>-</sup> SKOV3. Клон 8 BsAb против MUC16 был способен индуцировать мишень-специфический клеточный лизис клеточных линий MUC16<sup>+</sup> OVCAR3, SKOV8 и OVCA432. Клон 12 BsAb против MUC16 также индуцировал клеточный лизис MUC16<sup>+</sup>, хотя и в меньшей степени.

[0038] На **ФИГ. 9A** приведена иллюстративная схема эксперимента для исследования ксенотрансплантата яичника с использованием инъекций

модифицированных клеток SKOV3-MUC-CD, экспрессирующих MUC16, для формирования опухолей, и инъекций клона 8 BsAb против MUC16 для лечения. На **ФИГ. 9B** приведены иллюстративные данные визуализации, демонстрирующие формирование и лечение опухолей. На **ФИГ. 9C** приведены иллюстративные данные кривой выживаемости для эксперимента с ксенотрансплантатом. На **ФИГ. 9D** приведены иллюстративные данные, демонстрирующие индукцию цитокинов IL-2 и IFN- $\gamma$  после лечения мышей, несущих опухоли, клоном 8 BsAb против MUC16.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0039]** Настоящая заявка в одном аспекте относится к агентам антител против MUC16, таким как конструкции, связывающие MUC16, которые содержат компонент антитела, специфически распознающий эпитоп MUC16, такой как эпитоп сохраненного внеклеточного домена MUC16 (эктодомена MUC16).

**[0040]** С помощью технологии фагового дисплея были идентифицированы scFv, специфичные к сохраненному внеклеточному домену человеческого MUC16. Анализ методом проточной цитометрии показали, что эти антитела распознают клеточные линии рака, экспрессирующего MUC16. Таким образом, в настоящей заявке предложены агенты антител против MUC16, такие как конструкции, связывающие MUC16, которые содержат компонент антитела, иммуноспецифически связывающий MUC16. Агенты антител против MUC16 включают, например, антитела против MUC16, например, полноразмерные антитела против MUC16 и их антигенсвязывающие фрагменты, scFv против MUC16, слитые белки антител против MUC16 (например, слитые белки Fc против MUC16 и химерные антигенные рецепторы (CAR)), мультиспецифичные антитела, например, биспецифичные антитела, и конъюгаты антител против MUC16 (т. е. иммуноконъюгаты против MUC16).

**[0041]** В еще одном аспекте предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие агенты антител против MUC16, такие как антитела против MUC16, например, полноразмерные антитела против MUC16 и их антигенсвязывающие фрагменты, scFv против MUC16, слитые белки антител против MUC16 (например, слитые белки Fc против MUC16 и химерные антигенные рецепторы (CAR)), мультиспецифичные

антитела, например, биспецифичные антитела, и конъюгаты антител против MUC16 (т. е. иммуноконъюгаты против MUC16).

**[0042]** В еще одном аспекте предложены композиции, такие как фармацевтические композиции, содержащие агент антитела против MUC16, такой как полноразмерные антитела против MUC16 и их антигенсвязывающие фрагменты, scFv против MUC16, слитые белки антител против MUC16 (например, слитые белки Fc против MUC16 и химерные антигенные рецепторы (CAR)), мультиспецифичные антитела, например, биспецифичные антитела, и конъюгаты антител против MUC16 (т. е. иммуноконъюгаты против MUC16).

**[0043]** Также предложены способы получения и применения агентов антител и антител против MUC16, например, для лечения рака, а также наборы и изделия, пригодные для таких способов.

#### **ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

**[0044]** Если иное не указано, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, в целом имеют значение, общепринятое для специалиста в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. В следующих источниках для специалиста приведено общее определение многих терминов, используемых в настоящем изобретении: Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger *et al.*, (eds.), Springer Verlag (1991); и Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). В контексте настоящего документа следующие термины имеют значения, присвоенные им ниже, если не указано иное. Терминология, используемая в настоящем документе, приведена исключительно в целях описания конкретных вариантов осуществления и не имеет ограничительного характера в отношении настоящего изобретения.

**[0045]** В контексте настоящего документа термин «MUC 16» или «полипептид MUC 16» или «пептид MUC 16» относится к мембранно-связанному белку муцина MUC 16, как описано в Yin BW and Lloyd KO, 2001, *J Biol Chem.* 276(29):27371-5. Под регистрационным номером GenBank™ NP\_078966.2 (SEQ ID NO: 1) приведена иллюстративная последовательность нуклеиновой кислоты человеческого MUC 16. Под регистрационным номером GenBank™ NP 078966.2 (SEQ ID NO: 1) приведена

иллюстративная аминокислотная последовательность человеческого MUC 16. Нативный MUC 16 содержит внутриклеточный домен, трансмембранный домен, эктодомен вблизи предполагаемого сайта расщепления и большую, в высокой степени гликозилированную область из 12-20 повторов, каждый длиной 156 аминокислот (ФИГ. 1А). «Незрелый» MUC16 относится к SEQ ID NO: 1, содержащей сигнальную последовательность MUC16 (аминокислотные остатки 1-60 из SEQ ID NO: 1). «Зрелый MUC 16» относится к нативному MUC 16, в том виде, как он экспрессируется на клеточной поверхности, то есть, в котором сигнальная последовательность была удалена путем процессинга в клетке, например, SEQ ID NO: 32, где первые 60 аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1 были удалены (т. е. SEQ ID NO: 1 представляет собой «незрелую» форму MUC16).

**[0046]** Полипептид, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, называется в настоящем документе MUC16 C114 и состоит из 114 C-концевых аминокислотных остатков зрелого MUC16 (SEQ ID NO: 32 представляет собой последовательность зрелого MUC16). MUC16 C114 содержит эктодомен из 58 аминокислот, трансмембранный домен из 25 аминокислот и цитоплазматический хвост из 31 аминокислоты (ФИГ. 1В). MUC16c114 может быть N-гликозилирован по аминокислотным остаткам аспарагина в положениях 1, 24 и 30 в SEQ ID NO: 25 (также называемых аминокислотными положениями Asn1777, Asn1800 и Asn1806 в соответствии с оригинальной публикацией по MUC16 Yin BW and Lloyd KO, 2001, *J Biol Chem.* 276(29):27371-5).

**[0047]** В контексте настоящего документа употребление форм единственного числа также подразумевает включение форм множественного числа, если иное явно не следует из контекста.

**[0048]** В контексте настоящего документа термины «приблизительно» при использовании для изменения числового значения или числового диапазона указывают на то, что отклонения от 5% до 10% выше и от 5% до 10% ниже указанного значения или диапазона остаются в пределах предполагаемой величины указанного значения или диапазона.

**[0049]** В контексте настоящего документа термин «введение» агента или лекарственного средства субъекту включает любой способ введения или доставки

субъекту указанного агента для осуществления его предполагаемой функции. Введение можно осуществлять с помощью любого подходящего способа, включая, не ограничиваясь перечисленным, внутривенно, внутримышечно, внутривнутрибрюшинно, подкожно, и другие подходящие способы, описанные в настоящем документе. Введение включает самостоятельное введение и введение другим человеком.

**[0050]** Термин «аминокислота» относится к встречающимся в природе и не встречающимся в природе аминокислотам, а также аналогам и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Природные кодируемые аминокислоты представляют собой 20 общепринятых аминокислот (аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин), а также пирролизин и селеноцистеин. Аналоги аминокислот относятся к агентам, которые имеют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота, т. е.  $\alpha$ -углерод, связанный с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и группой R, например, гомосерин, норлейцин, сульфоксид метионина, метионин метилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные группы R (такие как норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты, образующие полипептид, находятся в D-форме. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты, образующие полипептид, находятся в L-форме. В некоторых вариантах осуществления первое множество аминокислот, образующих полипептид, находится в D-форме, а второе множество – в L-форме.

**[0051]** Аминокислоты обозначаются в настоящем документе либо общеизвестными трехбуквенными символами, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией IUPAC-IUB по биохимической номенклатуре. Нуклеотиды также обозначают их общепринятым однобуквенным кодом.

**[0052]** В контексте настоящего документа термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и означают полимер из аминокислотных остатков. Эти термины применимы к встречающимся в природе аминокислотным

полимерам, а также к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков представляет собой не встречающуюся в природе аминокислоту, например, аналог аминокислоты. Термины охватывают аминокислотные цепи любой длины, включая полноразмерные белки, где аминокислотные остатки связаны ковалентными пептидными связями.

**[0053]** В контексте настоящего документа «контроль» представляет собой альтернативный образец, используемый в эксперименте для целей сравнения. Контроль может быть «положительным» или «отрицательным». Например, когда целью эксперимента является определение корреляции эффективности терапевтического агента при лечении конкретного типа заболевания, как правило, используется положительный контроль (композиция, которая, как известно, проявляет желаемый терапевтический эффект) и отрицательный контроль (субъект или образец, который не получает терапию или получает плацебо).

**[0054]** В контексте настоящего документа термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству агента, достаточному для достижения желаемого терапевтического эффекта. В контексте терапевтического применения количество терапевтического пептида, вводимое субъекту, может зависеть от типа и тяжести инфекции и от характеристик индивидуума, таких как общее состояние здоровья, возраст, пол, масса тела и переносимость лекарственных средств. Оно также может зависеть от степени, тяжести и типа заболевания. Специалист в данной области техники сможет определить подходящие дозировки в зависимости от указанных и других факторов.

**[0055]** В контексте настоящего документа термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого полинуклеотиды транскрибируются в мРНК, и/или процессу, посредством которого транскрибированная мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Если полинуклеотид получен из геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке. Уровень экспрессии гена может быть определен путем измерения количества мРНК или белка в образце клетки или ткани. В одном из аспектов уровень экспрессии гена из одного образца может непосредственно сравниваться с уровнем экспрессии этого гена из контрольного или референсного образца. В другом аспекте уровень

экспрессии гена из одного образца может непосредственно сравниваться с уровнем экспрессии этого гена из того же образца после введения композиций, раскрытых в настоящем документе. Термин «экспрессия» также относится к одному или более из следующих событий: (1) получение матрицы РНК из последовательности ДНК (например, путем транскрипции) в клетке; (2) процессинг транскрипта РНК (например, путем сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэпа и/или образования 3'-конца) в клетке; (3) трансляцию последовательности РНК в полипептид или белок в клетке; (4) посттрансляционную модификацию полипептида или белка в клетке; (5) презентацию полипептида или белка на клеточной поверхности; и (6) секрецию, или презентацию, или высвобождение полипептида или белка из клетки.

**[0056]** Термин «линкер» относится к синтетическим последовательностям (например, аминокислотным последовательностям), которые соединяют или связывают две последовательности, например, которые связывают два полипептидных домена. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 из аминокислотных последовательностей.

**[0057]** В контексте настоящего документа термин «антитело» означает не только интактные молекулы антител, но и фрагменты молекул антител, которые сохраняют иммуноген-связывающую способность. Такие фрагменты также хорошо известны в данной области техники и регулярно используются как *in vitro*, так и *in vivo*. Соответственно, в контексте настоящего документа термин «антитело» означает не только интактные молекулы иммуноглобулина, но и хорошо известные активные фрагменты F(ab')<sub>2</sub> и Fab. F(ab')<sub>2</sub>- и Fab-фрагменты, в которых отсутствует Fc-фрагмент интактного антитела, более быстро выводятся из кровообращения и могут обладать менее неспецифичным тканевым связыванием интактного антитела (Wahl *et al.*, *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)). Антитела согласно изобретению включают целые нативные антитела, моноклональные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, верблюжьи антитела, мультиспецифичные антитела, биспецифичные антитела, химерные антитела, Fab, Fab', фрагменты V-области с одной цепью (scFv), однодоменные антитела (например, нанотела и однодоменные верблюжьи антитела), фрагменты V<sub>NAR</sub>, привлекающие Т-клетки биспецифичные антитела, минитела, связанные дисульфидными связями Fv (sdFv) и антиидиотипические (анти-ID)

антитела, интрацеллюлярные, слитые полипептиды, нетрадиционные антитела и антигенсвязывающие фрагменты любых из вышеперечисленных. В частности, антитела включают молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные фрагменты молекул иммуноглобулина, т. е. молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт. Молекулы иммуноглобулина могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса.

**[0058]** В отдельных вариантах осуществления антитело представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем документе  $V_H$ ) и константной области тяжелой цепи ( $C_H$ ). Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов,  $CH1$ ,  $CH2$  и  $CH3$ . Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем документе  $V_L$ ) и константной области легкой цепи  $C_L$ . Константная область легкой цепи состоит из одного домена,  $C_L$ . Области  $V_H$  и  $V_L$  могут быть дополнительно разделены на области (участки) гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными и называются каркасными областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классического пути системы комплемента. В контексте настоящего документа термины «антигенсвязывающая часть», «антигенсвязывающий фрагмент» или «антигенсвязывающая область» антитела используются взаимозаменяемо и относятся к области или части антитела, которая связывается с антигеном и которая придает антителу антигенную специфичность; фрагменты антигенсвязывающих белков, например, антител, включают один или более компонентов антитела, которые

сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, комплексом пептид/HLA). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры антигенсвязывающих частей антитела, охватываемых термином «фрагменты антитела», включают Fab-фрагмент – одновалентный фрагмент, состоящий из доменов  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$ ;  $F(ab')_2$ -фрагмент – двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов  $V_H$  и  $C_{H1}$ ; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов  $V_L$  и  $V_H$  одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward *et al.*, *Nature* 341 : 544-546 (1989)), который состоит из домена  $V_H$ ; и выделенную определяющую комплементарность область (CDR).

**[0059]** Антитела и фрагменты антител могут быть полностью или частично происходить от млекопитающих (например, людей, приматов, отличных от человека, коз, морских свинок, хомяков, лошадей, мышей, крыс, кроликов и овец) или животных, продуцирующих антитела, отличных от млекопитающих (например, кур, уток, гусей, змей, хвостатых земноводных). Антитела и фрагменты антител могут быть получены в организме животных или получены вне организма животных, например, из дрожжей или фага (например, в виде одного антитела или фрагмента антитела, или в составе библиотеки антител).

**[0060]** Более того, несмотря на то, что два домена Fv-фрагмента –  $V_L$  и  $V_H$  – кодируются отдельными генами, их можно соединять с применением рекомбинантных методов с помощью синтетического линкера, который обеспечивает их получение в виде одной белковой цепи, в которой области  $V_L$  и  $V_H$  соединяются в пару с образованием одновалентных молекул. Они известны как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988); и Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 5879-5883 (1988). Эти фрагменты антител получают с применением стандартных методов, известных специалисту в данной области техники, и указанные фрагменты подвергают такому же скринингу на предмет пригодности, как и интактные антитела.

**[0061]** «Выделенное антитело» или «выделенный антигенсвязывающий белок» представляет собой антитело или белок, которые были идентифицированы и отделены

и/или извлечены из компонента их естественной среды. «Синтетические антитела» или «рекомбинантные антитела», как правило, получают с использованием рекомбинантной технологии или с использованием методов пептидного синтеза, известных специалисту в данной области техники.

**[0062]** В контексте настоящего документа термин «одноцепочечный переменный фрагмент» или «scFv» представляет собой слитый белок переменных областей тяжелой ( $V_H$ ) и легкой цепей ( $V_L$ ) иммуноглобулина (например, мышинового или человеческого), ковалентно связанных с образованием гетеродимера  $V_H:V_L$ . Тяжелая ( $V_H$ ) и легкая цепи ( $V_L$ ) либо соединены напрямую, либо соединены кодирующим пептид линкером (например, приблизительно 10, 15, 20, 25 аминокислот), который соединяет N-конец  $V_H$  с C-концом  $V_L$ , либо C-конец  $V_H$  с N-концом  $V_L$ . Линкер обычно богат глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости. Линкер может связывать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена.

**[0063]** Несмотря на удаление константных областей и введение линкера, белки scFv сохраняют специфичность исходного иммуноглобулина. Антитела одноцепочечных полипептидов Fv могут быть экспрессированы из нуклеиновой кислоты, содержащей последовательности, кодирующие  $V_H$  и  $V_L$ , как описано Huston, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988)). См. также патенты США № 5091513, 5132405 и 4956778; и публикации патентных заявок США № 20050196754 и 20050196754. Описаны антагонистические scFv, обладающие ингибирующей активностью (см., например, Zhao *et al.*, *Hybridoma (Larchmt)* 27(6):455-51 (2008); Peter *et al.*, *J Cachexia Sarcopenia Muscle* (2012); Shieh *et al.*, *J Immunol* 183(4):2277-85 (2009); Giomarelli *et al.*, *Thromb Haemost* 97(6):955-63 (2007); Fife *et al.*, *J Clin Invest* 116(8):2252-61 (2006); Brocks *et al.*, *Immunotechnology* 3(3): 173-84 (1997); Moosmayer *et al.*, *Ther Immunol* 2(10):31- 40 (1995). Описаны агонистические scFv, обладающие стимулирующей активностью (см., например, Peter *et al.*, *J Biol Chem* 278(38):36740-7 (2003); Xie *et al.*, *Nat Biotech* 15(8):768-71 (1997); Ledbetter *et al.*, *Crit Rev Immunol* 17(5-6):427-55 (1997); Ho *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1638(3):257-66 (2003)).

**[0064]** В контексте настоящего документа «F(ab)» относится к фрагменту структуры антитела, который связывается с антигеном, но является одновалентным и

не имеет Fc-части, например, антитело, расщепленное ферментом папаином, дает два F(ab)-фрагмента и Fc-фрагмент (например, константную область тяжелой (H) цепи; Fc-область, которая не связывается с антигеном).

**[0065]** В контексте настоящего документа «F(ab')<sub>2</sub>» относится к фрагменту антитела, полученному путем расщепления пепсином целых антител IgG, где этот фрагмент имеет две антигенсвязывающие (ab') (двухвалентные) области, где каждая (ab') область содержит две отдельные аминокислотные цепи, часть H-цепи и легкой (L) цепи, связанные S-S-связью, для связывания антигена, и где остальные части H-цепи связаны друг с другом. Фрагмент «F(ab')<sub>2</sub>» может быть разделен на два отдельных Fab'-фрагмента.

**[0066]** В контексте настоящего документа «CDR» определены как аминокислотные последовательности определяющих комплементарность областей антитела, которые представляют собой гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. См., например, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Как правило, антитела содержат три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи или области CDR в вариабельной области. CDR обеспечивают большую часть контактных остатков для связывания антитела с антигеном или эпитопом. В отдельных вариантах осуществления области CDR определены с использованием системы Kabat (Kabat, E. A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242(1991)).

**[0067]** В контексте настоящего документа термины «константная область» или «константный домен» являются взаимозаменяемыми и имеют общепринятое в данной области техники значение. Константная область представляет собой часть антитела, например, карбоксиконцевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая непосредственно не участвует в связывании антитела с антигеном, но которая может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константная область молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с вариабельным доменом иммуноглобулина.

**[0068]** В контексте настоящего документа «эпитоп» представляет собой термин в данной области техники и может относиться к ограниченной области антигена, с которой антитело может иммуноспецифически связываться. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или смежный эпитоп) или эпитоп может, например, собираться из двух или более несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп).

**[0069]** В контексте настоящего документа термин «лиганд» относится к молекуле, которая связывается с рецептором. В частности, лиганд связывает рецептор на другой клетке, обеспечивая распознавание и/или взаимодействие между клетками.

**[0070]** В контексте настоящего документа термин «аффинность» означает меру силы связывания. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что аффинность зависит от близости стереохимического соответствия между сайтами объединения антител и антигенными детерминантами, от размера области контакта между ними и от распределения заряженных и гидрофобных групп. Аффинность также включает термин «авидность», который относится к силе связи антиген-антитело после образования обратимых комплексов (например, либо одновалентных, либо мультивалентных). Способы расчета аффинности антитела к антигену известны в данной области техники и включают использование экспериментов по связыванию для расчета аффинности. Активность антител в функциональных анализах (например, анализе методом проточной цитометрии) также отражает аффинность антител. Антитела и аффинность могут быть фенотипически охарактеризованы и сравнены с помощью функциональных анализов (например, анализа методом проточной цитометрии). Молекулы нуклеиновых кислот, пригодные для применения в раскрытом в настоящем документе изобретении, включают любую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид или его фрагмент. В отдельных вариантах осуществления молекулы нуклеиновых кислот, пригодные для применения в раскрытом в настоящем документе изобретении, включают молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитело или его антигенсвязывающую часть. Такие молекулы нуклеиновых кислот не обязательно должны быть на 100% идентичны эндогенной последовательности нуклеиновой кислоты, но, как правило, будут демонстрировать

существенную идентичность. Полинуклеотиды, обладающие «существенной гомологией» или «существенной идентичностью» с эндогенной последовательностью, как правило, способны гибридизоваться по меньшей мере с одной цепью двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты. Под «гибридизацией» подразумевается спаривание с образованием двухцепочечной молекулы между комплементарными полинуклеотидными последовательностями (например, геном, описанным в настоящем документе) или их частями при различных условиях жесткости. (См., например, Wahl, G. M. and S. L. Berger, *Methods Enzymol.* 152:399 (1987); Kimmel, A. R., *Methods Enzymol.* 152:507 (1987)).

**[0071]** В контексте настоящего документа термины «иммуноспецифически связывается», «иммуноспецифически распознает», «специфически связывается» и «специфически распознает» являются аналогичными терминами в контексте антител и относятся к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с антигеном (например, эпитопом или иммунным комплексом) через антигенсвязывающие сайты, как понятно специалисту в данной области техники, и не исключают перекрестную реактивность антитела или антигенсвязывающего фрагмента с другими антигенами.

**[0072]** Термины «по существу гомологичный» или «по существу идентичный» означают полипептид или молекулу нуклеиновой кислоты, демонстрирующие по меньшей мере 50% или более гомологию или идентичность референсной аминокислотной последовательности (например, любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе) или последовательности нуклеиновой кислоты (например, любой из последовательностей нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе). Например, такая последовательность по меньшей мере приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95% или приблизительно на 99% гомологична или идентична, на уровне аминокислоты или нуклеиновой кислоты, последовательности, используемой для сравнения (например, последовательности дикого типа или нативной последовательности). В некоторых вариантах осуществления по существу гомологичный или по существу идентичный полипептид

содержит одну или более аминокислотных замен, инсерций или делеций по сравнению с последовательностью, используемой для сравнения. В некоторых вариантах осуществления по существу гомологичный или по существу идентичный полипептид содержит одну или более неестественных аминокислот или аналогов аминокислот, включая D-аминокислоты и ретроинверсные аминокислоты, для замены гомологичных последовательностей.

**[0073]** Гомологию последовательностей или идентичность последовательностей обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей (например, пакет программного обеспечения для анализа последовательностей от Genetics Computer Group, Биотехнологический центр Университета Висконсина, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, программы BLAST, BESTFIT, GAP или PILEUP/PRETTYBOX). Такое программное обеспечение находит идентичные или схожие последовательности путем присвоения степеней гомологии различным заменам, делециям и/или другим модификациям. В иллюстративном подходе к определению степени идентичности может быть использована программа BLAST, где оценка вероятности между  $e^{-3}$  и  $e^{-100}$  указывает на близкородственную последовательность.

**[0074]** В контексте настоящего документа термин «аналог» относится к структурно родственному полипептиду или молекуле нуклеиновой кислоты, имеющей функцию референсного полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты.

**[0075]** В контексте настоящего документа термин «консервативная модификация последовательности» относится к аминокислотной модификации, которая по существу не влияет или не изменяет характеристики связывания раскрытого в настоящей заявке агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего указанную аминокислотную последовательность. Консервативные модификации могут включать аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации могут быть введены в человеческий scFv раскрытого в настоящем документе антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента с помощью стандартных методов, известных в данной области техники, таких как сайт-специфический мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Аминокислоты можно классифицировать на группы в соответствии с их физико-химическими свойствами,

такими как заряд и полярность. Консервативные аминокислотные замены представляют собой такие, при которых аминокислотный остаток заменяется аминокислотой из той же группы. Например, аминокислоты можно классифицировать по заряду: положительно заряженные аминокислоты включают лизин, аргинин, гистидин, отрицательно заряженные аминокислоты включают аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, нейтрально заряженные аминокислоты включают аланин, аспарагин, цистеин, глутамин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин. Кроме того, аминокислоты можно классифицировать по полярности: полярные аминокислоты включают аргинин (основный полярный), аспарагин, аспарагиновую кислоту (кислая полярная), глутаминовую кислоту (кислая полярная), глутамин, гистидин (основный полярный), лизин (основный полярный), серин, треонин и тирозин; неполярные аминокислоты включают аланин, цистеин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан и валин. Таким образом, один или более аминокислотных остатков в области CDR может быть заменен другими аминокислотными остатками из той же группы, и измененное антитело может быть протестировано на сохранение функции (т. е. функций, изложенных в пунктах (с) - (1) выше) с использованием функциональных анализов, описанных в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления не более одного, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти остатков в указанной последовательности или области CDR являются измененными.

**[0076]** В контексте настоящего документа термин «гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты или полипептид» относится к молекуле нуклеиновой кислоты (например, молекуле кДНК, ДНК или РНК) или полипептиду, которые обычно отсутствуют в клетке или образце, полученном из клетки. Эта нуклеиновая кислота может происходить из другого организма, или она может представлять собой, например, молекулу мРНК, которая обычно не экспрессируется в клетке или образце.

**[0077]** В контексте настоящего документа термин «модулировать» относится к положительному или отрицательному изменению. Иллюстративные величины модулирования включают изменение приблизительно на 1%, приблизительно на 2%, приблизительно на 5%, приблизительно на 10%, приблизительно на 25%, приблизительно на 50%, приблизительно на 75% или приблизительно на 100%.

**[0078]** В контексте настоящего документа термин «увеличение» относится к положительному изменению по меньшей мере приблизительно на 5%, включая, не ограничиваясь перечисленным, положительное изменение приблизительно на 5%, приблизительно на 10%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 50%, приблизительно на 75% или приблизительно на 100%.

**[0079]** В контексте настоящего документа термин «снижение» относится к отрицательному изменению по меньшей мере приблизительно на 5%, включая, не ограничиваясь перечисленным, отрицательное изменение приблизительно на 5%, приблизительно на 10%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 50%, приблизительно на 75% или приблизительно на 100%.

**[0080]** В контексте настоящего документа «выделенный» полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, присутствующих в природном источнике (например, в организме мыши или человека) молекулы нуклеиновой кислоты. Кроме того, «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может быть по существу свободной от другого клеточного материала или культуральной среды при получении рекомбинантными методами или по существу свободной от химических прекурсоров или других химических веществ при химическом синтезе. Например, выражение «по существу свободный» включает препараты полинуклеотида или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие менее чем приблизительно 15%, 10%, 5%, 2%), 1%), 0,5%) или 0,1%) другого материала, например, клеточного материала, культуральной среды, других молекул нуклеиновой кислоты, химических прекурсоров и/или других химических веществ.

**[0081]** В контексте настоящего документа термин «выделенная клетка» относится к клетке, которая отделена от молекулярных и/или клеточных компонентов, которые естественным образом сопровождают клетку.

**[0082]** «Эффективное количество» (или «терапевтически эффективное количество») представляет собой количество, достаточное для обеспечения полезного или желаемого клинического результата при лечении. Эффективное количество может быть введено субъекту одной или более дозами. С точки зрения лечения эффективное количество представляет собой количество, достаточное для паллиативного

воздействия, облегчения, стабилизации, обращения вспять или замедления прогрессирования заболевания (например, новообразования) или иным образом уменьшения патологических последствий заболевания (например, новообразования). Эффективное количество обычно определяется врачом в каждом конкретном случае и находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники. При определении подходящей дозировки для достижения эффективного количества обычно учитывают несколько факторов. Эти факторы включают возраст, пол и массу тела субъекта, состояние, подлежащее лечению, тяжесть состояния, а также форму и эффективную концентрацию вводимых сконструированных иммунных клеток.

**[0083]** В контексте настоящего документа термин «новообразование» относится к заболеванию, характеризующемуся патологической пролиферацией клетки или ткани и последующей ее миграцией или инвазией в другие ткани или органы. Рост новообразований обычно является неконтролируемым и прогрессирующим и происходит в условиях, которые не вызвали бы или вызвали бы прекращение размножения нормальных клеток. Новообразования могут поражать различные типы клеток, ткани или органы, включая, не ограничиваясь перечисленным, орган, выбранный из группы, состоящей из мочевого пузыря, ободочной кишки, кости, головного мозга, молочной железы, хряща, глии, пищевода, фаллопиевой трубы, желчного пузыря, сердца, кишечника, почки, печени, легкого, лимфатического узла, нервной ткани, яичников, плевры, поджелудочной железы, предстательной железы, скелетной мышцы, кожи, спинного мозга, селезенки, желудка, яичек, тимуса, щитовидной железы, трахеи, мочеполового тракта, мочеочника, уретры, матки и влагалища, или их тканей или типов клеток. Новообразование включает раковые заболевания, такие как саркомы, карциномы или плазмоцитомы (злокачественная опухоль из плазматических клеток).

**[0084]** В контексте настоящего документа термин «лечить» или «лечение» относится к клиническому вмешательству в попытке изменить течение заболевания индивидуума или клетки, подлежащих лечению, и может проводиться либо для профилактики, либо в ходе развития клинической патологии. Терапевтические эффекты лечения включают, не ограничиваясь перечисленным, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых

прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазов, снижение скорости прогрессирования заболевания, смягчение или временное облегчение течения заболевания и ремиссию или улучшение прогноза. Путем предотвращения прогрессирования заболевания или расстройства лечение может предотвращать ухудшение вследствие расстройства у заболевшего или диагностированного субъекта или субъекта с подозрением на наличие указанного расстройства, но также лечение может предотвращать манифестацию расстройства или симптома расстройства у субъекта, подверженного риску развития указанного расстройства или подозреваемого на наличие указанного расстройства.

**[0085]** В контексте настоящего документа термин «субъект» относится к любому животному (например, млекопитающему), включая, не ограничиваясь перечисленным, людей, приматов, отличных от человека, грызунов и тому подобное (например, которое должно быть реципиентом определенного лечения или у которого собирают клетки).

**[0086]    Агенты антител против MUC16**

**[0087]** В настоящем документе предложены агенты антител против MUC16, которые иммуноспецифически связываются с MUC16. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 иммуноспецифически связывается с сохранившимся внеклеточным доменом MUC16. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 представляет собой конструкцию, связывающую MUC16, которая содержит компонент антитела, иммуноспецифически связывающийся с MUC16. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 представляет собой антитело против MUC16 (например, полноразмерное антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент). В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 связывается с клеткой, экспрессирующей MUC16 (например, раковой клеткой, экспрессирующей MUC16).

**[0088]** Агенты антител против MUC16, такие как антитела против MUC16 или их антигенсвязывающие фрагменты, могут включать, например, моноклональные антитела, поликлональные антитела, рекомбинантно полученные антитела, моноспецифичные антитела, мультиспецифичные антитела (включая биспецифичные антитела (BsAb)), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные

антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару легкой цепи и тяжелой цепи антитела, интратела, однодоменные антитела, одновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), верблюжьи антитела, афтитела и связанные дисульфидными связями Fv (dsFv), Fc-слитые белки, иммуноконъюгаты или их фрагменты. Такие антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены способами, известными в данной области техники.

**[0089]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 представляет собой полноразмерное антитело (например, полноразмерный IgG) или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с MUC16.

**[0090]** В некоторых вариантах осуществления ссылка на агент антитела, иммуноспецифически связывающийся с MUC16, означает, что агент антитела связывается с MUC16 с аффинностью, которая по меньшей мере приблизительно в 10 раз (включая, например, по меньшей мере приблизительно в 10,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  или  $10^7$  раз) превышает аффинность его связывания с отличным от мишени антигеном. В некоторых вариантах осуществления отличный от мишени антиген представляет собой антиген, отличный от MUC16. Аффинность связывания может быть определена способами, известными в данной области техники, такими как ELISA, анализ методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) или анализ радиоиммунопреципитации (РИА).  $K_d$  может быть определена способами, известными в данной области техники, такими как анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием, например, инструментов Biacore, или анализ кинетического исключения (KinExA) с использованием, например, инструментов Sapidyne.

**[0091]** Хотя в настоящем документе подробно обсуждаются агенты антител против MUC16, содержащие человеческие последовательности (например, последовательности переменных доменов человеческой тяжелой и легкой цепи, содержащие человеческие последовательности CDR), также рассматриваются агенты антител против MUC16 нечеловеческого происхождения. В некоторых вариантах

осуществления агенты антител против MUC16 нечеловеческого происхождения содержат человеческие последовательности CDR из агента антитела против MUC16, как описано в настоящем документе, и каркасные последовательности нечеловеческого происхождения. Каркасные последовательности нечеловеческого происхождения включают, в некоторых вариантах осуществления, любую последовательность, которая может быть использована для получения синтетических переменных доменов тяжелой и/или легкой цепи с использованием одной или более человеческих последовательностей CDR, как описано в настоящем документе, включая, например, млекопитающих, например, мышь, крысу, кролика, свинью, крупный рогатый скот (например, корову, быка, буйвола), оленя, овцу, козу, курицу, кошку, собаку, хорька, примата (например, мартышку, макака-резуса) и т. д. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 нечеловеческого происхождения включает агент антитела против MUC16, полученный путем прививки одной или более человеческих последовательностей CDR, как описано в настоящем документе, на каркасную последовательность нечеловеческого происхождения (например, куриную или мышиную каркасную последовательность).

**[0092]** Полная аминокислотная последовательность иллюстративного человеческого MUC16 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16, описанный в настоящем документе, специфически распознает эпитоп в человеческом MUC16. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16, описанный в настоящем документе, специфически распознает эпитоп в пределах сохраненного внеклеточного домена человеческого MUC16. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16, описанный в настоящем документе, иммуноспецифически связывается с эктодоменом MUC16 (фиг. 1). В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16, описанный в настоящем документе, иммуноспецифически связывается с клеткой, экспрессирующей человеческий MUC16. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16, описанный в настоящем документе, иммуноспецифически связывается с клеткой, экспрессирующей рекомбинантный полипептид MUC16. В некоторых вариантах осуществления полипептид MUC16 представляет собой MUC16-c344,

имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления полипептид MUC16 представляет собой MUC16-s114, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

**[0093]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 перекрестно реагирует с полипептидом MUC16 от вида, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 полностью специфичен к человеческому MUC16 и не проявляет видовую перекрестную реактивность или перекрестную реактивность с другими видами, отличными от человека.

**[0094]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 специфически распознает MUC16, экспрессируемый на клеточной поверхности раковой клетки (такой как солидная опухоль). В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 специфически распознает MUC16, экспрессируемый на клеточной поверхности одной или более из клеток рака яичника, клеток рака молочной железы, клеток рака предстательной железы, клеток рака ободочной кишки, клеток рака легкого, клеток рака головного мозга, клеток рака поджелудочной железы, клеток рака почки, клеток рака фаллопиевой трубы, клеток рака матки (например, эндометрия), клеток первичного рака брюшины или раковых клеток любой другой ткани, экспрессирующей MUC16. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 специфически распознает MUC16, экспрессируемый на клеточной поверхности линии раковых клеток, например, клеточных линий рака яичника, таких как OVCAR3, OVCA-432, OVCA-433 и CAOV3.

**[0095]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 перекрестно реагирует по меньшей мере с одним аллельным вариантом белка MUC16 или его фрагментами. В некоторых вариантах осуществления аллельный вариант имеет до приблизительно 30, например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или 30 аминокислотных замен, таких как консервативная аминокислотная замена, по сравнению с природным MUC16 или его фрагментами. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 не вступает в перекрестную реакцию с каким-либо аллельным вариантом белка MUC16 или его фрагментами.

**[0096]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 перекрестно реагирует с по меньшей мере одним межвидовым вариантом белка MUC16. В некоторых вариантах осуществления, например, белок MUC16 или его фрагменты представляет собой человеческий MUC16, а межвидовой вариант белка MUC16 или его фрагменты представляет собой его мышинный или крысиный вариант. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 не вступает в перекрестную реакцию с любым межвидовым вариантом белка MUC16.

**[0097]** В некоторых вариантах осуществления согласно любому из агентов антитела против MUC16, описанных в настоящем документе, агент антитела против MUC16 содержит компонент антитела против MUC16, который специфически связывается с MUC16. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит константную область тяжелой цепи антитела и константную область легкой цепи антитела.

**[0098]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит константную область тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит константную область тяжелой цепи IgG2. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит константную область тяжелой цепи IgG3.

**[0099]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит константную область тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

**[0100]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит константную область тяжелой цепи IgG4. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи IgG4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29.

**[0101]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит константную область легкой лямбда-цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30.

**[0102]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит константную область легкой каппа-цепи.

**[0103]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи антитела и переменный домен легкой цепи антитела.

**[0104]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий одну, две или три HC-CDR из SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 переменного домена тяжелой цепи с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, представленный в SEQ ID NO: 2.

**[0105]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий одну, две или три LC-CDR из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 переменного домена легкой цепи с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3, представленные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен легкой цепи, представленный в SEQ ID NO: 3.

**[0106]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 переменного домена тяжелой цепи с SEQ ID NO: 2, и переменный домен

легкой цепи, содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 переменного домена легкой цепи с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно, и переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3, представленные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 2, и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, представленный в SEQ ID NO: 2, и переменный домен легкой цепи, представленный в SEQ ID NO: 3.

**[0107]** В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или ее вариант, содержащий до приблизительно 5 (например, приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных замен или обладающий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее вариант, содержащий до приблизительно 5 (например, приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных замен или обладающий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности SEQ ID NO: 3.

**[0108]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий одну, две или три HC-CDR из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 переменного домена тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3, представленные в SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи,

содержащий SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, представленный в SEQ ID NO: 10.

**[0109]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий одну, две или три LC-CDR из SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 переменного домена легкой цепи с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3, представленные в SEQ ID NO: 15, 16 и 17, соответственно. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен легкой цепи, представленный в SEQ ID NO: 11.

**[0110]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 переменного домена тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10, и переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 переменного домена легкой цепи с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно, и переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3, представленные в SEQ ID NO: 15, 16 и 17, соответственно. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 10, и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 содержит переменный домен тяжелой цепи, представленный в SEQ ID NO: 10, и переменный домен легкой цепи, представленный в SEQ ID NO: 11.

**[0111]** В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или ее

вариант, содержащий до приблизительно 5 (например, приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных замен или обладающий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или ее вариант, содержащий до приблизительно 5 (например, приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных замен или обладающий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности SEQ ID NO: 11.

**[0112]** Иллюстративные аминокислотные последовательности приведены в таблицах ниже. Иллюстративные последовательности CDR в таблице 2 прогнозированы с использованием алгоритма IgBLAST. См., например, Ye J. *et al.*, *Nucleic Acids Research* 41:W34-W40 (2013), содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Специалистам в данной области техники будет ясно, что известны многие алгоритмы для прогнозирования положений CDR в переменных областях тяжелой цепи и легкой цепи антитела, и агенты антител, содержащие CDR из антител, описанных в настоящем документе, но основанных на алгоритмах прогнозирования, отличных от IgBLAST, находятся в пределах объема настоящего изобретения.

**[0113]** Иллюстративные последовательности переменной области тяжелой цепи и легкой цепи антитела выделены в соответствии с INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM<sup>®</sup> (Международная иммуногенетическая информационная система, IMGT). См., например, Lefranc, M.-P. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 43:D413-422 (2015), содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Специалисту в данной области техники будет ясно, что агенты антител, содержащие последовательности V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> из антител, описанных в настоящем документе, но основанные на алгоритмах, отличных от IMGT, находятся в пределах объема настоящего изобретения.

**Таблица 2. Иллюстративные последовательности CDR антитела против MUC16.**

Идентификационный № клона	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3
---------------------------	---------	---------	---------

8	GGSFSGYY (SEQ ID NO: 4)	INHSGST (SEQ ID NO: 5)	ARQSYITDS (SEQ ID NO: 6)
12	GGSFSGYY (SEQ ID NO: 12)	INHSGST (SEQ ID NO: 13)	ARWSPFSYKQMYDY (SEQ ID NO: 14)
Идентификационный № клона	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
8	QDVSKW (SEQ ID NO: 7)	AAS (SEQ ID NO: 8)	QQANSFPWT (SEQ ID NO: 9)
12	RGSIASAY (SEQ ID NO: 15)	EDY (SEQ ID NO: 16)	QSYDDNDHVI (SEQ ID NO: 17)

**Таблица 3. Иллюстративные последовательности доменов VH и VL антитела против MUC16.**

Идентификационный № клона	Описание	Последовательность
8	Домен VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGL EWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAV YYCARQSYITDSWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 2)
8	Домен VL	DIQLTQSPSAVSASVGDRTITCRASQDVSKWLAWYQQKPGKAPR LLISAASGLQSWVPSRFSGSGSGTEFTLSSISLQPEDFATYYCQQANS FPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 3)
12	Домен VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGL EWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRIIMSVDTSKRQFSLKLRSAADTAV YYCARWSPFSYKQMYDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 10)
12	Домен VL	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSRGSIASAYVQWYQQRPGSAPIT VIYEDYERPSEIPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYD DNDHVIFFGGGTVTVLG (SEQ ID NO: 11)

**[0114] Полноразмерное антитело против MUC16**

**[0115]** Агент антитела против MUC16 в некоторых вариантах осуществления представляет собой полноразмерное антитело против MUC16. В некоторых вариантах осуществления полноразмерное антитело против MUC16 представляет собой IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. В некоторых вариантах осуществления полноразмерное антитело против MUC16 содержит константные домены IgG, такие как константные домены

любого из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, включая их варианты. В некоторых вариантах осуществления полноразмерное антитело против MUC16 содержит константную область легкой лямбда-цепи. В некоторых вариантах осуществления полноразмерное антитело против MUC16 содержит константную область легкой каппа-цепи. В некоторых вариантах осуществления полноразмерное антитело против MUC16 представляет собой полноразмерное человеческое антитело против MUC16. В некоторых вариантах осуществления полноразмерное антитело против MUC16 содержит последовательность Fc мышинового иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления полноразмерное антитело против MUC16 содержит последовательность Fc, которая была модифицирована или иным образом изменена таким образом, что она имеет усиленную эффекторную функцию, представляющую собой антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) или комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ).

**[0116]** Таким образом, например, в некоторых вариантах осуществления предложено полноразмерное антитело против MUC16, содержащее константные домены IgG1 или IgG4, где антитело против MUC16 специфически связывается с MUC16 на опухолевой клетке. В некоторых вариантах осуществления IgG1 представляет собой человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления IgG4 представляет собой человеческий IgG4. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи против MUC16 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28 или 29. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи против MUC16 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи против MUC16 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28 или 29, и константная область легкой цепи против MUC16 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления связывание антитела против MUC16 с экспрессирующей MUC16 клеткой (например, экспрессирующей MUC16 раковой клеткой) ингибирует рост опухоли или метастазирование опухоли, или индуцирует регрессию опухоли. В некоторых вариантах осуществления связывание антитела против MUC16 с экспрессирующей

MUC16 клеткой (например, экспрессирующей MUC16 раковой клеткой) ингибирует инвазию *in vitro* экспрессирующих MUC16 клеток в Matrigel.

**[0117]** В некоторых вариантах осуществления предложено полноразмерное антитело против MUC16, содержащее константные домены IgG1 или IgG4, где антитело против MUC16 содержит а) переменный домен тяжелой цепи, содержащий HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и б) переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления IgG1 представляет собой человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления IgG4 представляет собой человеческий IgG4. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи против MUC16 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28 или 29. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи против MUC16 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30.

**[0118]** В некоторых вариантах осуществления предложено полноразмерное антитело против MUC16, содержащее константные домены IgG1 или IgG4, где антитело против MUC16 содержит а) переменный домен тяжелой цепи, содержащий HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и б) переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления IgG1 представляет собой человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления IgG4 представляет собой человеческий IgG4. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи против MUC16 содержит или состоит из

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28 или 29. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи против MUC16 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30.

**[0119] Химерные конструкции, связывающие MUC16**

**[0120]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR) против MUC16 или его вариант, специфически связывающийся с MUC16. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 представляет собой CAR против MUC16. CAR хорошо известны в данной области техники, и агент антитела против MUC16 может представлять собой CAR, соответствующий любому CAR, известному в данной области техники, например, как описано в Sadelain *et al.*, *Nature* 545: 423- 431 (2017), содержание которого явным образом включено в настоящий документ для использования в настоящем изобретении и для возможного включения в один или более пунктов формулы настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления CAR против MUC16 содержит компонент антитела против MUC16 в соответствии с любым из компонентов антитела против MUC16, описанных в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления предложен CAR против MUC16, содержащий компонент антитела против MUC16. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 в CAR против MUC16 содержит а) переменный домен тяжелой цепи антитела, содержащий HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и б) переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или ее вариант, обладающий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 3 или ее вариант, обладающий по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности.

**[0121]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 в CAR против MUC16 содержит а) переменный домен тяжелой цепи, содержащий HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и б) переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или ее вариант, обладающий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или ее вариант, обладающий по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности.

**[0122]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 представляет собой химерный рецептор против MUC16, содержащий трансмембранные домены Т-клеточного рецептора (TCR). Например, в некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 представляет собой антитело-Т-клеточный рецептор (abTCR), как описано в публикации патентной заявки РСТ WO2017070608, содержание которой явным образом включено в настоящий документ для использования в настоящем изобретении и для возможного включения в один или более пунктов формулы настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления abTCR против MUC16 содержит компонент антитела против MUC16 в соответствии с любым из компонентов антитела против MUC16, описанных в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления предложен abTCR против MUC16, содержащий компонент антитела против MUC16.

**[0123]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 в abTCR против MUC16 содержит а) переменный домен тяжелой цепи антитела,

содержащий HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и b) переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи абTCR против MUC16 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или ее вариант, обладающий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее вариант, обладающий по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности.

**[0124]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 в абTCR против MUC16 содержит а) переменный домен тяжелой цепи, содержащий HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и b) переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи абTCR против MUC16 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или ее вариант, обладающий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или ее вариант, обладающий по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности.

**[0125]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 представляет собой химерный костимулирующий рецептор, содержащий компонент антитела против MUC16, специфически связывающийся с MUC16, и костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления химерный костимулирующий рецептор против MUC16 способен стимулировать иммунную клетку, на поверхности которой он функционально экспрессируется при связывании MUC16. В некоторых вариантах осуществления химерный костимулирующий рецептор против MUC16 не имеет функциональной первичной сигнальной последовательности иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления химерный костимулирующий рецептор против MUC16 не содержит какой-либо первичной сигнальной последовательности иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления химерный костимулирующий рецептор против MUC16 содержит одну полипептидную цепь, содержащую компонент антитела против MUC16, трансмембранный домен и костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления химерный костимулирующий рецептор против MUC16 содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, причем первая и вторая полипептидные цепи вместе образуют компонент антитела против MUC16, трансмембранный модуль и костимулирующий сигнальный модуль, содержащий костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая полипептидные цепи представляют собой отдельные полипептидные цепи, а химерный костимулирующий рецептор против MUC16 представляет собой мультимер, такой как димер. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны, например, пептидной связью, или другой химической связью, такой как дисульфидная связь. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь связаны по меньшей мере одной дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 представляет собой Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub>, Fv или одноцепочечный Fv (scFv).

**[0126]** Примеры костимулирующих сигнальных доменов иммунных клеток для применения в химерных костимулирующих рецепторах против MUC16 согласно изобретению включают цитоплазматические последовательности корцепторов T-

клеточного рецептора (TCR), которые могут действовать согласованно с химерным рецептором (например, CAR или abTCR) для инициирования трансдукции сигнала после связывания с химерным рецептором, а также любое производное или вариант этих последовательностей и любую синтетическую последовательность, которая обладает такой же функциональной способностью.

**[0127]** Известно, что сигналов, генерируемых только через TCR, недостаточно для полной активации Т-клетки, и что также требуется вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток опосредована двумя различными классами внутриклеточных сигнальных последовательностей: теми, которые иницируют антиген-зависимую первичную активацию через TCR (называемыми в настоящем документе «первичными сигнальными последовательностями иммунных клеток») и теми, которые действуют антиген-независимым образом для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (называемыми в настоящем документе «костимулирующими сигнальными последовательностями иммунных клеток»).

**[0128]** Первичные сигнальные последовательности иммунных клеток, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM-содержащих первичных сигнальных последовательностей иммунных клеток включают последовательности, полученные из TCR $\zeta$ , FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. «Функциональная» первичная сигнальная последовательность иммунных клеток представляет собой последовательность, способную трансдуцировать сигнал активации иммунных клеток, будучи функционально связанной с соответствующим рецептором. «Нефункциональные» первичные сигнальные последовательности иммунных клеток, которые могут содержать фрагменты или варианты первичных сигнальных последовательностей иммунных клеток, неспособны трансдуцировать сигнал активации иммунных клеток. Химерные костимулирующие рецепторы против MUC16, описанные в настоящем документе, не содержат функциональной первичной сигнальной последовательности иммунных клеток, такой как функциональная сигнальная последовательность, содержащая ITAM. В некоторых вариантах осуществления химерные

костимулирующие рецепторы против MUC16 не содержит какой-либо первичной сигнальной последовательности иммунных клеток.

**[0129]** Костимулирующая сигнальная последовательность иммунных клеток может представлять собой часть внутриклеточного домена костимулирующей молекулы, включая, например, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганд, специфически связывающийся с CD83, и т. п.

**[0130]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 химерного костимулирующего рецептора против MUC16 содержит а) HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и б) переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или ее вариант, обладающий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее вариант, обладающий по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности.

**[0131]** В некоторых вариантах осуществления компонент антитела против MUC16 химерного костимулирующего рецептора против MUC16 содержит а) переменный домен тяжелой цепи, содержащий HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и б) переменный домен легкой цепи, содержащий LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В

некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или ее вариант, обладающий по меньшей мере приблизительно 95% (например, по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или ее вариант, обладающий по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности.

**[0132]** В некоторых вариантах осуществления химерный костимулирующий рецептор против MUC16 экспрессируется в иммунной клетке. В некоторых вариантах осуществления химерный костимулирующий рецептор против MUC16 экспрессируется в иммунной клетке, которая экспрессирует другой химерный рецептор. В некоторых вариантах осуществления другой химерный рецептор представляет собой CAR или abTCR. В некоторых вариантах осуществления другой химерный рецептор связывается с MUC16. В некоторых вариантах осуществления другой химерный рецептор не связывается с MUC16. В некоторых вариантах осуществления другой химерный рецептор связывается с антигеном, связанным с раком, характеризующимся высокой экспрессией MUC16 и/или высоким аэробным гликолизом. В некоторых вариантах осуществления другой химерный рецептор связывается с антигеном, связанным с любым из видов рака, описанных в настоящем документе (таких как рак почки, рак шейки матки, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак ободочной кишки, рак головного мозга или рак поджелудочной железы). В некоторых вариантах осуществления другой химерный рецептор связывается с антигеном, связанным с раком почки. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечно-клеточную карциному (ПЧК). В некоторых вариантах осуществления ПЧК представляет собой метастатическую ПЧК. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления экспрессия химерного костимулирующего рецептора против MUC16 в иммунной клетке является индуцибельной. В некоторых вариантах осуществления экспрессия химерного костимулирующего рецептора против MUC16 в иммунной клетке индуцируется при передаче сигнала через другой химерный рецептор.

**[0133]    *Аффинность связывания***

**[0134]**    Аффинность связывания может быть определена посредством  $K_d$ ,  $K_{off}$ ,  $K_{on}$  или  $K_a$ . Под термином « $K_{off}$ » в контексте настоящего документа подразумевается константа скорости диссоциации агента антитела из комплекса агент антитела/антиген, как определено в условиях кинетической селекции. Под термином « $K_{on}$ » в контексте настоящего документа подразумевается константа скорости ассоциации агента антитела с антигеном с образованием комплекса агент антитела/антиген. Термин равновесная константа диссоциации « $K_d$ » в контексте настоящего документа относится к константе диссоциации конкретного взаимодействия агент антитела-антиген и описывает концентрацию антигена, необходимую для занятия половины всех антитело-связывающих доменов, присутствующих в растворе молекул агента антитела в равновесном состоянии, и равна  $K_{off}/K_{on}$ . Измерение  $K_d$  предполагает, что все связывающие агенты находятся в растворе. В случае, когда агент антитела связан с клеточной стенкой, например, в системе экспрессии в клетках дрожжей, соответствующую равновесную константу скорости выражают как EC50, что дает хорошее приближение для  $K_d$ . Константа аффинности,  $K_a$ , представляет собой величину, обратную константе диссоциации,  $K_d$ .

**[0135]**    Константа диссоциации ( $K_d$ ) используется в качестве индикатора, отражающего аффинность компонентов антител к антигенам. Например, простой анализ возможен с помощью метода Скэтчарда с использованием агентов антител, меченых различными маркерными агентами, а также с помощью *Viacore* (производства *Amersham Biosciences*), анализа биомолекулярных взаимодействий с помощью поверхностного плазмонного резонанса, согласно руководству пользователя и прилагаемому набору. Значение  $K_d$ , которое может быть получено с помощью этих методов, выражается в единицах М (моль). Агент антитела, специфически связывающийся с мишенью, может иметь  $K_d$ , например,  $\leq 10^{-7}$  М,  $\leq 10^{-8}$  М,  $\leq 10^{-9}$  М,  $\leq 10^{-10}$  М,  $\leq 10^{-11}$  М,  $\leq 10^{-12}$  М или  $\leq 10^{-13}$  М.

**[0136]**    Специфичность связывания агента антитела может быть определена экспериментально методами, известными в данной области техники. Такие методы включают, не ограничиваясь перечисленным, вестерн-блоттинг, ELISA-, РИА-, ECL-, IRMA-, EIA-, *Viacore*-тесты и пептидное сканирование. В некоторых вариантах

осуществления аффинность связывания агента антитела против MUC16 измеряют путем тестирования аффинности связывания агента антитела против MUC16 с клетками, экспрессирующими MUC16 на поверхности (например, клетками HepG2).

**[0137]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 специфически связывается с MUC16-мишенью (например, nMUC16) с  $K_d$  от приблизительно  $10^{-7}$  М до приблизительно  $10^{-13}$  М (например, от приблизительно  $10^{-7}$  М до приблизительно  $10^{-13}$  М, от приблизительно  $10^{-9}$  М до приблизительно  $10^{-13}$  М или от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-12}$  М). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления  $K_d$  связывания между агентом антитела против nMUC16 и nMUC16,  $K_d$  связывания между агентом антитела против sMUC16 и sMUC16 или  $K_d$  связывания между агентом антитела против MUC16 и MUC16 (в любом формате) составляет от приблизительно  $10^{-7}$  М до приблизительно  $10^{-13}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-13}$  М, от приблизительно  $10^{-7}$  М до приблизительно  $10^{-12}$  М, от приблизительно  $10^{-7}$  М до приблизительно  $10^{-11}$  М, от приблизительно  $10^{-7}$  М до приблизительно  $10^{-10}$  М, от приблизительно  $10^{-7}$  М до приблизительно  $10^{-9}$  М, от приблизительно  $10^{-8}$  М до приблизительно  $10^{-13}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-13}$  М, от приблизительно  $10^{-8}$  М до приблизительно  $10^{-12}$  М, от приблизительно  $10^{-8}$  М до приблизительно  $10^{-11}$  М, от приблизительно  $10^{-8}$  М до приблизительно  $10^{-10}$  М, от приблизительно  $10^{-8}$  М до приблизительно  $10^{-9}$  М, от приблизительно  $5 \times 10^{-9}$  М до приблизительно  $1 \times 10^{-13}$  М, от приблизительно  $5 \times 10^{-9}$  М до приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М, от приблизительно  $5 \times 10^{-9}$  М до приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М, от приблизительно  $5 \times 10^{-9}$  М до приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М, от приблизительно  $10^{-9}$  М до приблизительно  $10^{-13}$  М, от приблизительно  $10^{-9}$  М до приблизительно  $10^{-12}$  М, от приблизительно  $10^{-9}$  М до приблизительно  $10^{-11}$  М, от приблизительно  $10^{-9}$  М до приблизительно  $10^{-10}$  М, от приблизительно  $5 \times 10^{-10}$  М до приблизительно  $1 \times 10^{-13}$  М, от приблизительно  $5 \times 10^{-10}$  М до приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М, от приблизительно  $5 \times 10^{-10}$  М до приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М, от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-13}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-13}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М до приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-12}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М до приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М, от приблизительно  $10^{-11}$  М до приблизительно

$10^{-13}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-13}$  М, от приблизительно  $10^{-11}$  М до приблизительно  $10^{-12}$  М или от приблизительно  $10^{-12}$  М до приблизительно  $10^{-13}$  М. В некоторых вариантах осуществления  $K_d$  связывания между агентом антитела против nMUC16 и MUC16 составляет от приблизительно  $10^{-7}$  М до приблизительно  $10^{-13}$  М.

**[0138]** В некоторых вариантах осуществления  $K_d$  связывания между агентом антитела против MUC16 и отличным от мишени антигеном больше, чем  $K_d$  связывания между агентом антитела против MUC16 и мишенью, и в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения называется аффинностью связывания агента антитела против MUC16 с мишенью (например, связанным с клеточной поверхностью MUC16), более высокой, чем с отличным от мишени антигеном. В некоторых вариантах осуществления отличный от мишени антиген представляет собой антиген, отличный от MUC16. В некоторых вариантах осуществления  $K_d$  связывания между агентом антитела против MUC16 (против nMUC16) и мишенью, отличной от MUC16, может быть по меньшей мере приблизительно в 10 раз, например, приблизительно в 10-100 раз, приблизительно в 100-1000 раз, приблизительно в  $10^3$ - $10^4$  раз, приблизительно в  $10^4$ - $10^5$  раз, приблизительно в  $10^5$ - $10^6$  раз, приблизительно в  $10^6$ - $10^7$  раз, приблизительно в  $10^7$ - $10^8$  раз, приблизительно в  $10^8$ - $10^9$  раз, приблизительно в  $10^9$ - $10^{10}$  раз, приблизительно в  $10^{10}$ - $10^{11}$  раз или приблизительно в  $10^{11}$ - $10^{12}$  раз больше, чем  $K_d$  связывания между агентом антитела против MUC16 и MUC16-мишенью.

**[0139]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 связывается с отличным от мишени антигеном с  $K_d$  от приблизительно  $10^{-1}$  М до приблизительно  $10^{-6}$  М (например, от приблизительно  $10^{-1}$  М до приблизительно  $10^{-6}$  М, от приблизительно  $10^{-1}$  М до приблизительно  $10^{-5}$  М или от приблизительно  $10^{-2}$  М до приблизительно  $10^{-4}$  М). В некоторых вариантах осуществления отличный от мишени антиген представляет собой антиген, отличный от MUC16. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления  $K_d$  связывания между агентом антитела против MUC16 и мишенью, отличной от MUC16, составляет от приблизительно  $10^{-1}$  М до приблизительно  $10^{-6}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-1}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-6}$  М, от приблизительно  $10^{-1}$  М до приблизительно  $10^{-5}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-1}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-5}$  М, от приблизительно  $10^{-1}$  М до приблизительно  $10^{-4}$  М, от

приблизительно  $1 \times 10^{-1}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-4}$  М, от приблизительно  $10^{-1}$  М до приблизительно  $10^{-3}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-1}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-3}$  М, от приблизительно  $10^{-1}$  М до приблизительно  $10^{-2}$  М, от приблизительно  $10^{-2}$  М до приблизительно  $10^{-6}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-2}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-6}$  М, от приблизительно  $10^{-2}$  М до приблизительно  $10^{-5}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-2}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-5}$  М, от приблизительно  $10^{-2}$  М до приблизительно  $10^{-4}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-2}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-4}$  М, от приблизительно  $10^{-2}$  М до приблизительно  $10^{-3}$  М, от приблизительно  $10^{-3}$  М до приблизительно  $10^{-6}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-3}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-6}$  М, от приблизительно  $10^{-3}$  М до приблизительно  $10^{-5}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-3}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-5}$  М, от приблизительно  $10^{-3}$  М до приблизительно  $10^{-4}$  М, от приблизительно  $10^{-4}$  М до приблизительно  $10^{-6}$  М, от приблизительно  $1 \times 10^{-4}$  М до приблизительно  $5 \times 10^{-6}$  М, от приблизительно  $10^{-4}$  М до приблизительно  $10^{-5}$  М или от приблизительно  $10^{-5}$  М до приблизительно  $10^{-6}$  М.

**[0140]** В некоторых вариантах осуществления, когда речь идет о том, что агент антитела против MUC16 специфически распознает MUC16-мишень (например, связанный с клеточной поверхностью MUC16) с высокой аффинностью связывания и связывается с отличным от мишени антигеном с низкой аффинностью связывания, агент антитела против MUC16 будет связываться с MUC16-мишенью (например, связанным с клеточной поверхностью MUC16) с  $K_d$  от приблизительно  $10^{-7}$  М до приблизительно  $10^{-13}$  М (например, от приблизительно  $10^{-7}$  М до приблизительно  $10^{-13}$  М, от приблизительно  $10^{-9}$  М до приблизительно  $10^{-13}$  М или от приблизительно  $10^{-10}$  М до приблизительно  $10^{-12}$  М), и будет связываться с отличным от мишени антигеном с  $K_d$  от приблизительно  $10^{-1}$  М до приблизительно  $10^{-6}$  М (например, от приблизительно  $10^{-1}$  М до приблизительно  $10^{-6}$  М, от приблизительно  $10^{-1}$  М до приблизительно  $10^{-5}$  М или от приблизительно  $10^{-2}$  М до приблизительно  $10^{-4}$  М).

**[0141]** В некоторых вариантах осуществления, когда речь идет о том, что агент антитела против MUC16 специфически распознает связанный с клеточной поверхностью MUC16, аффинность связывания агента антитела против MUC16 сравнивают с контрольным агентом антитела против MUC16. В некоторых вариантах осуществления  $K_d$  связывания между контрольным агентом антитела против MUC16 и

связанным с клеточной поверхностью MUC16 может быть по меньшей мере приблизительно в 2 раза, например, приблизительно в 2 раза, приблизительно в 3 раза, приблизительно в 4 раза, приблизительно в 5 раз, приблизительно в 6 раз, приблизительно в 7 раз, приблизительно в 8 раз, приблизительно в 9 раз, приблизительно в 10 раз, приблизительно в 10-100 раз, приблизительно в 100-1000 раз, приблизительно в  $10^3$ - $10^4$  раз, приблизительно в  $10^4$ - $10^5$  раз, приблизительно в  $10^5$ - $10^6$  раз, приблизительно в  $10^6$ - $10^7$  раз, приблизительно в  $10^7$ - $10^8$  раз, приблизительно в  $10^8$ - $10^9$  раз, приблизительно в  $10^9$ - $10^{10}$  раз, приблизительно в  $10^{10}$ - $10^{11}$  раз или приблизительно в  $10^{11}$ - $10^{12}$  раз больше, чем  $K_d$  связывания между агентом антитела против pMUC16, описанным в настоящем документе, и связанным с клеточной поверхностью MUC16.

**[0142]      *Функциональная активность агентов антител против Muc16***

**[0143]**      В отдельных вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, ингибирует инвазию *in vitro* клеток, рекомбинантно экспрессирующих полипептид MUC16, в Matrigel. В некоторых вариантах осуществления MUC16 содержит SEQ ID NO: 25 (MUC16 c114). В отдельных вариантах осуществления клетки, рекомбинантно экспрессирующие гликозилированный MUC16 c114, представляют собой клетки SKOV3. В отдельных вариантах осуществления полипептид MUC16 является гликозилированным. В отдельных вариантах осуществления гликозилированная форма полипептида MUC16 является N-гликозилированной по аминокислотному остатку Asn30 (соответствующему Asn1806 зрелого MUC16 (SEQ ID NO: 1)). В отдельных вариантах осуществления полипептид MUC16 является N-гликозилированным по аминокислотным остаткам Asn24 и Asn30 (соответствующим Asn1800 и Asn1806, соответственно, зрелого MUC16 (SEQ ID NO: 1)). В отдельных вариантах осуществления полипептид MUC16 является N-гликозилированным по аминокислотным остаткам Asn1, Asn24 и Asn30 SEQ ID NO: 25 (также называемым Asn1777, Asn1800 и Asn1806, соответственно, в Yin and Lloyd (2001) *J Biol Chem* 276: 27371–27375). В отдельных вариантах осуществления гликозилирование содержит N-связанную хитобиозу. В отдельных вариантах осуществления гликозилирование состоит из N-связанной хитобиозы. В отдельных вариантах осуществления инвазия в

Matrigel ингибируется по меньшей мере в 1,25, 1,5, 1,75, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз по сравнению с инвазией в Matrigel *in vitro* клеток, где клетки обрабатывают контрольным антителом (например, антителом, не нацеленным на MUC16). В отдельных вариантах осуществления инвазия в Matrigel ингибируется приблизительно в 1,25, 1,5, 1,75, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз по сравнению с инвазией в Matrigel *in vitro* клеток, где клетки обрабатывают контрольным антителом (например, антителом, не нацеленным на MUC16).

**[0144]**     Анализы для определения опосредованного агентом антитела против MUC16 или антигенсвязывающим фрагментом ингибирования инвазии в Matrigel известны специалисту в данной области техники. Например, вставки или камеры для инвазии BD BioCoat™ Matrigel™ (кат. № 354480 в 24-луночном планшете) и контрольные вставки (кат. № 354578 в 24-луночном планшете) могут быть приобретены у BD Biosciences, Массачусетс. Анализ инвазии в Matrigel может быть проведен в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, камерам Matrigel в 24-луночных планшетах (хранившихся при -20 °C) и контрольных вставках (хранившихся при 4 °C) дают нагреться до комнатной температуры. Обе вставки регидратируют 0,5 мл бессывороточной среды во вставке, а также во внешней лунке 24-луночного планшета, в течение 2 часов при 37 °C в инкубаторе с увлажненной атмосферой с 5% CO<sub>2</sub>. Культивируемые клетки SKOV3 трипсинизируют и промывают культуральной средой. Миллион клеток отделяют в другую центрифужную пробирку и промывают 3 раза бессывороточной средой. Количество этих клеток затем корректируют для получения 5000 клеток в 0,5 мл бессывороточной среды. Среду в регидратированных вставках удаляют, и вставку переносят в новый 24-луночный планшет, содержащий культуральную среду с 0,75 мл 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) в лунке, которая служит хемоаттрактантом. Во вставку сразу же добавляют 0,5 мл клеток (5000 клеток) в бессывороточной среде. Надлежащим образом следят за тем, чтобы пузырьки воздуха не попали во вкладку и наружную лунку. 24-луночный планшет инкубируют при 37 °C в инкубаторе с увлажненной атмосферой с 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 часов. После инкубации неинвазивировавшие клетки удаляют с верхней поверхности мембраны путем «очистки» путем введения ватного тампона на палочке в Matrigel или контрольную вставку и осторожного приложения давления при перемещении наконечника тампона

по поверхности мембраны. Очистку повторяют вторым тампоном, смоченным средой. Затем вставки окрашивают в новом 24-луночном планшете, содержащем 0,5 мл 0,5% красителя кристаллического фиолетового в дистиллированной воде, в течение 30 минут. После окрашивания вставки промывают в 3 стаканах дистиллированной воды для удаления избытка красителя. Вставки сушат на воздухе в новом 24-луночном планшете. Инвазивировавшие клетки подсчитывают вручную под инвертированным микроскопом при 200-кратном увеличении. Несколько полей трех параллельных образцов мембран подсчитывают и отмечают на фигуре.

**[0145]** В отдельных вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, способен ингибировать или снижать метастазирование, ингибировать рост опухоли или индуцировать регрессию опухоли в модельных исследованиях на мышах. Например, линии опухолевых клеток могут быть введены бестимусным мышам линии nude, и бестимусным мышам может быть введен агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, один или более раз, и можно контролировать прогрессирование опухоли из инъецированных опухолевых клеток в течение нескольких недель и/или месяцев. В некоторых случаях введение агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента бестимусным мышам линии nude может иметь место до введения линий опухолевых клеток. В отдельном варианте осуществления для мышинных ксенотрансплантатных моделей, описанных в настоящем документе, используют клетки SKOV3, экспрессирующие MUC16 c114.

**[0146]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, ингибирует рост опухоли или индуцирует регрессию опухоли в мышинной модели по меньшей мере на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100%, согласно оценке с помощью способов, описанных в настоящем документе или известных специалисту в данной области техники, по сравнению с мышами, получавшими имитацию лечения. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, ингибирует рост

опухоли или индуцирует регрессию опухоли в мышинной модели по меньшей мере на приблизительно 25% или 35%, необязательно до приблизительно 75%, согласно оценке с помощью способов, описанных в настоящем документе или известных специалисту в данной области техники, по сравнению с мышами, получавшими имитацию лечения. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, ингибирует рост опухоли или индуцирует регрессию опухоли в мышинной модели по меньшей мере приблизительно в 1 раз, 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, согласно оценке с помощью способов, описанных в настоящем документе или известных специалисту в данной области техники, по сравнению с мышами, получавшими имитацию лечения. Мышам, получающим имитацию лечения, можно, например, вводить натрий-фосфатный буфер или контроль (например, антитело против IgG).

**[0147]** Определение ингибирования роста опухоли или регрессии опухоли может быть оценено, например, путем наблюдения за размером опухоли в течение некоторого периода времени, например, путем физического измерения пальпируемых опухолей или других способов визуального обнаружения. Например, могут быть генерированы линии опухолевых клеток с рекомбинантной экспрессией визуализирующего агента, такого как зеленый флуоресцентный белок (GFP) или люцифераза, затем может быть проведена визуализация GFP *in vivo* с помощью микроскопии, а визуализация люциферазы *in vivo* может быть проведена путем введения субстрата люциферазы мышам с ксенотрансплантатами и обнаружения люминесценции за счет процессинга ферментом люциферазой субстрата люциферазы. Степень или уровень обнаружения GFP или люциферазы коррелирует с размером опухоли у мышей с ксенотрансплантатами.

**[0148]** В отдельных вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, может увеличивать выживаемость животных в моделях ксенотрансплантатов опухолей по сравнению с мышами, получавшими имитацию лечения. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент,

описанный в настоящем документе, повышает выживаемость мышей в моделях ксенотрансплантатов опухолей по меньшей мере на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, согласно оценке с помощью способов, описанных в настоящем документе или известных специалисту в данной области техники, по сравнению с мышами, получавшими имитацию лечения. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, повышает выживаемость мышей в моделях ксенотрансплантатов опухолей по меньшей мере приблизительно на 25% или 35%, необязательно до приблизительно 75%, согласно оценке с помощью способов, описанных в настоящем документе или известных специалисту в данной области техники, по сравнению с мышами, получавшими имитацию лечения, в моделях ксенотрансплантатов опухолей. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, повышает выживаемость мышей в моделях ксенотрансплантатов опухолей по меньшей мере приблизительно в 1 раз, 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, согласно оценке с помощью способов, описанных в настоящем документе или известных специалисту в данной области техники, по сравнению с мышами, получавшими имитацию лечения, в моделях ксенотрансплантатов опухолей. Выживаемость может, например, быть определена путем построения кривой выживаемости, представляющей собой зависимость количества выживших мышей от времени (например, дней или недель) после инъекции линии опухолевых клеток. Мышам, получающим имитацию лечения, можно, например, вводить натрий-фосфатный буфер или контроль (например, антитело против IgG).

**[0149]** В отдельных вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, интернализируется в клетку, экспрессирующую полипептид MUC16, при контакте клетки с агентом антитела против MUC16 или его антигенсвязывающим фрагментом. «Интернализованный» или «интернализация» применительно к молекуле, которая

интернализируется клеткой, относится к прохождению молекулы, находящейся в контакте с внеклеточной поверхностью клеточной мембраны, через клеточную мембрану к внутриклеточной поверхности клеточной мембраны и/или в клеточную цитоплазму. В отдельных вариантах осуществления клетки, рекомбинантно экспрессирующие гликозилированный MUC16 c114, представляют собой клетки SKOV3. В отдельных вариантах осуществления гликозилированная форма MUC16 c114 является N-гликозилированной, например, по Asn1, Asn24 и Asn30 SEQ ID NO: 25 (также называемым Asn1777, Asn1800 и Asn1806, соответственно, в Yin and Lloyd (2001) *J Biol Chem* 276: 27371–27375). В отдельных вариантах осуществления гликозилирование содержит N-связанную хитобиозу. В отдельных вариантах осуществления гликозилирование состоит из N-связанной хитобиозы.

**[0150]**     Анализы для определения интернализации агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе, в клетку, например, использование меченых радиоактивным изотопом антител, известны специалисту в данной области техники. Например, интернализацию меченого <sup>89</sup>Zr антитела можно исследовать на клетках SKOV3, экспрессирующих MUC16 c114. Вкратце, приблизительно  $1 \times 10^5$  клеток высевают в 12-луночный планшет и инкубируют в течение ночи при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. В каждую лунку добавляют объем меченого радиоактивным изотопом белка и инкубируют планшеты при 37 °C и 4 °C в течение 1, 5, 12 и 24 часов. После каждого периода инкубации среду собирают и промывают клетки 1 мл натрий-фосфатного буфера (PBS). Активность поверхностно-связанных клеток собирают путем промывки клеток в 1 мл 100 мМ уксусной кислоты 100 мМ глицином (1:1, pH 3,5) при 4 °C. Затем прилипшие клетки лизируют 1 мл 1 М NaOH. Каждый промывочный раствор собирают и подсчитывают активность. Отношение активности конечного промывочного раствора к общей активности всех промывочных растворов используют для определения % интернализации. В отдельных вариантах осуществления анализ проводят при 37 °C. В отдельных вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент интернализуется по меньшей мере в 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 процентах клеток, инкубированных с агентом антитела против MUC16 или его антигенсвязывающим фрагментом. В отдельных вариантах осуществления агент

антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент интернализуется в приблизительно 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 процентах клеток, инкубированных с агентом антитела против MUC16 или его антигенсвязывающим фрагментом. В отдельных вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент интернализуется в течение 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20 или 24 часов после приведения клеток в контакта с агентом антитела против MUC16 или его антигенсвязывающим фрагментом.

**[0151]     *Нуклеиновые кислоты***

**[0152]**     Также рассматриваются молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие агенты антител против MUC16 или их антигенсвязывающий фрагмент (такие как антитела против MUC16, например, полноразмерные антитела против MUC16). В некоторых вариантах осуществления предложена нуклеиновая кислота (или набор нуклеиновых кислот), кодирующая полноразмерное антитело против MUC16, включая любое из полноразмерных антител против MUC16, описанных в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота (или набор нуклеиновых кислот), кодирующая агент антитела против MUC16, описанный в настоящем документе, может дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептидную метку (такую как метка для очистки белка, например, His-метка, HA-метка).

**[0153]**     Также в настоящем документе рассматриваются выделенные клетки-хозяева, содержащие агент антитела против MUC16, выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептидные компоненты агента антитела против MUC16, или вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептидные компоненты агента антитела против MUC16, описанные в настоящем документе.

**[0154]**     Настоящая заявка также включает варианты этих последовательностей нуклеиновых кислот. Например, указанные варианты включают нуклеотидные последовательности, которые гибридизуются с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими агенты антител против MUC16 (такие как антитела против MUC16, например, полноразмерные антитела против MUC16), их антигенсвязывающие фрагменты или компоненты антител против MUC16 согласно настоящей заявке при по меньшей мере умеренно жестких условиях гибридизации.

**[0155]** Настоящее изобретение также относится к векторам, в которые вставлена нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению.

**[0156]** Вкратце, экспрессия агента антитела против MUC16 (например, полноразмерного антитела против MUC16) или его антигенсвязывающего фрагмента природной или синтетической нуклеиновой кислотой, кодирующей агент антитела против MUC16, может быть достигнута путем вставки нуклеиновой кислоты в подходящий вектор экспрессии, так что нуклеиновая кислота функционально связана с 5'- и 3'-регуляторными элементами, включая, например, промотор (например, лимфоцит-специфичный промотор) и 3'-нетранслируемую область (UTR). Векторы могут быть пригодны для репликации и встраивания в клетки-хозяева эукариот. Типичные векторы клонирования и экспрессии содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, пригодные для регуляции экспрессии желаемой последовательности нуклеиновой кислоты.

**[0157]** Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению также могут применяться для иммунизации нуклеиновыми кислотами и генной терапии с помощью стандартных протоколов доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области техники. См., например, патенты США № 5399346, 5580859, 5589466, полностью включенные в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен генотерапевтический вектор.

**[0158]** Нуклеиновая кислота может быть клонирована в ряд типов векторов. Например, нуклеиновая кислота может быть клонирована в вектор, включающий, не ограничиваясь перечисленным, плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус животных и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы генерации зонда и векторы секвенирования.

**[0159]** Кроме того, вектор экспрессии может быть предоставлен клетке в виде вирусного вектора. Вирусная векторная технология хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Green and Sambrook (2013, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, пригодные в качестве векторов, включают, не ограничиваясь перечисленным, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы и лентивирусы. Как правило,

подходящий вектор содержит точку начала репликации, функциональную по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, подходящие сайты рестрикции эндонуклеазой и один или более селективируемых маркеров (см., например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6326193).

**[0160]** Был разработан ряд вирусных систем для переноса генов в клетки млекопитающих. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген может быть вставлен в вектор и упакован в ретровирусные частицы с использованием методов, известных в данной области техники. Рекомбинантный вирус затем может быть выделен и доставлен в клетки субъекта *in vivo* либо *ex vivo*. В данной области техники известен ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления применяют аденовирусные векторы. В данной области техники известен ряд аденовирусных векторов. В некоторых вариантах осуществления применяют лентивирусные векторы. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочное, стабильное встраивание трансгена и его размножение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом по сравнению с векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкоза мышей, в том, что они могут трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенности.

**[0161]** Дополнительные промоторные элементы, например, энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области 30-110 п.о. выше стартового сайта, хотя недавно было показано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже стартового сайта. Расстояние между промоторными элементами часто является гибким, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются друг относительно друга. В промоторе тимидинкиназы (tk) расстояние между промоторными элементами может быть увеличено до 50 п.о., прежде чем активность начнет снижаться.

**[0162]** Одним из примеров подходящего промотора является последовательность предраннего промотора цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная

последовательность представляет собой сильную конститутивную промоторную последовательность, способную вызывать высокие уровни экспрессии любой функционально связанной с ней полинуклеотидной последовательности. Другим примером подходящего промотора является фактор удлинения-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ). Однако также могут быть использованы другие конститутивные промоторные последовательности, включая, не ограничиваясь перечисленным, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), вирус опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинных концевых повторов (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, предранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы человеческих генов, такие как, не ограничиваясь перечисленным, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Кроме того, изобретение не должно ограничиваться применением конститутивных промоторов. Индуцибельные промоторы также рассматриваются в качестве части изобретения. Применение индуцибельного промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда такая экспрессия желательна, или выключать экспрессию, когда экспрессия нежелательна. Примеры индуцибельных промоторов включают, не ограничиваясь перечисленным, промотор металлотионина, глюкокортикоидный промотор, промотор прогестерона и промотор тетрациклина.

**[0163]** В некоторых вариантах осуществления экспрессия агента антитела против MUC16 является индуцибельной. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая агент антитела против MUC16, функционально связана с индуцибельным промотором, включая любой индуцибельный промотор, описанный в настоящем документе.

**[0164]** Индуцибельные промоторы

**[0165]** Применение индуцибельного промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда такая экспрессия желательна, или выключать экспрессию, когда экспрессия нежелательна. Иллюстративные индуцибельные промоторные системы для применения в

эукариотических клетках включают, не ограничиваясь перечисленными, гормон-регулируемые элементы (см., например, Mader, S. and White, J. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5603-5607 (1993)), синтетические лиганд-регулируемые элементы (см., например, Spencer, D. M. et al 1993) *Science* 262: 1019-1024) и элементы, регулируемые ионизирующим излучением (см., например, Manome, Y. et al., *Biochemistry* 32: 10607-10613 (1993); Datta, R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1014- 10153 (1992)). Дополнительные иллюстративные индуцибельные промоторные системы для применения в системах млекопитающих *in vitro* или *in vivo* рассмотрены в Gingrich et al., *Annual Rev. Neurosci* 21:377-405 (1998). В некоторых вариантах осуществления индуцибельная промоторная система для применения для экспрессии агента антитела против MUC16 представляет собой систему Tet. В некоторых вариантах осуществления индуцибельная промоторная система для применения для экспрессии агента антитела против MUC16 представляет собой систему lac-репрессора из *E. coli*.

**[0166]** Иллюстративная индуцибельная промоторная система для применения в настоящем изобретении представляет собой систему Tet. Такие системы основаны на системе Tet, описанной Gossen et al., (1993). В иллюстративном варианте осуществления представляющий интерес полинуклеотид находится под контролем промотора, который содержит один или более сайтов Tet-оператора (TetO). В неактивном состоянии Tet-репрессор (TetR) будет связываться с сайтами TetO и подавлять транскрипцию из промотора. В активном состоянии, например, в присутствии индуктора, такого как тетрациклин (Tc), ангидротетрациклин, доксициклин (Dox) или его активный аналог, индуктор вызывает высвобождение TetR из TetO, тем самым обеспечивая возможность транскрипции. Доксициклин является членом тетрациклиновой группы антибиотиков, имеющим химическое название 1-диметиламино-2,4а,5,7,12-пентагидрокси-11-метил-4,6-диоксо-1,4а,11,11а,12,12а-гексагидротетрацен-3-карбоксамид.

**[0167]** В одном из вариантов осуществления TetR является кодон-оптимизированным для экспрессии в клетках млекопитающих, например, мышинных или человеческих клетках. Большинство аминокислот кодируются более чем одним кодоном из-за вырожденности генетического кода, что позволяет значительно изменять нуклеотидную последовательность отдельно взятой нуклеиновой кислоты без

каких-либо изменений аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеиновой кислотой. Однако многие организмы демонстрируют различия в использовании кодонов, также известные как «частота кодонов» (т. е. частота использования конкретного кодона(ов) для отдельно взятой аминокислоты). Частота кодонов часто коррелирует с присутствием преобладающего вида тРНК для конкретного кодона, что, в свою очередь, повышает эффективность трансляции мРНК. Соответственно, кодирующая последовательность, происходящая от конкретного организма (например, прокариота), может быть адаптирована для улучшения экспрессии в другом организме (например, эукариоте) посредством оптимизации кодонов.

**[0168]** Другие конкретные варианты системы Tet включают следующие системы «Tet-Off» и «Tet-On». В системе Tet-Off транскрипция неактивна в присутствии Tc или Dox. В этой системе тетрациклин-контролируемый трансаактиваторный белок (tTA), который состоит из TetR, слитого с сильным трансаактивирующим доменом VP16 из вируса простого герпеса, регулирует экспрессию нуклеиновой кислоты-мишени, которая находится под транскрипционным контролем тетрациклин-чувствительного промоторного элемента (TRE). TRE состоит из конкатамеров последовательности TetO, слитых с промотором (обычно минимальной промоторной последовательностью, происходящей из предраннего промотора цитомегаловируса человека (hCMV)). В отсутствие Tc или Dox tTA связывается с TRE и активирует транскрипцию гена-мишени. В присутствии Tc или Dox tTA не может связываться с TRE, и экспрессия из гена-мишени остается неактивной.

**[0169]** И наоборот, в системе Tet-On транскрипция активна в присутствии Tc или Dox. Система Tet-On основана на обратном тетрациклин-контролируемом трансаактиваторе rtTA. Как и tTA, rtTA представляет собой слитый белок, состоящий из репрессора TetR и трансаактивирующего домена VP16. Тем не менее, изменение четырех аминокислот в ДНК-связывающем компоненте TetR изменяет характеристики связывания rtTA таким образом, что он может распознавать только последовательности tetO в TRE трансгена-мишени в присутствии Dox. Таким образом, в системе Tet-On транскрипция TRE-регулируемого гена-мишени стимулируется rtTA только в присутствии Dox.

**[0170]** Еще одна индуцибельная промоторная система представляет собой систему lac-репрессора из *E. coli* (см. Brown et al., Cell 49:603-612 (1987)). Система lac-репрессора функционирует путем регулирования транскрипции представляющего интерес полинуклеотида, функционально связанного с промотором, содержащим lac-оператор (lacO). Lac-репрессор (lacR) связывается с LacO, тем самым предотвращая транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида. Экспрессия представляющего интерес полинуклеотида индуцируется подходящим индуцирующим агентом, например, изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозидом (IPTG).

**[0171]** Для оценки экспрессии полипептида или его частей вектор экспрессии, подлежащий введению в клетку, может также содержать либо селектируемый маркерный ген, либо репортерный ген, либо и то, и другое для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые необходимо трансфицировать или инфицировать посредством вирусных векторов. В других аспектах селектируемый маркер может быть перенесен на отдельном фрагменте ДНК и использован в процедуре котрансфекции. Как селектируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Подходящие селектируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как neo и т. п.

**[0172]** Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В целом, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует в организме- или ткани-реципиенте или не экспрессируется ими, и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется каким-либо легко обнаружимым свойством, например, ферментативной активностью. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящий момент после введения ДНК в клетки-реципиенты. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие люциферазу,  $\beta$ -галактозидазу, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, секретлируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tel *et al.*, 2000 *FEBS Letters* 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены с использованием известных методов или приобретены. В целом,

конструкцию с минимальной 5'-фланкирующей областью, демонстрирующую наивысший уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируют как промотор. Такие промоторные области могут быть связаны с репортерным геном и использованы для оценки агентов на предмет способности модулировать транскрипцию, управляемую промотором.

**[0173]** В некоторых вариантах осуществления предложена нуклеиновая кислота, кодирующая полноразмерное антитело против MUC16 согласно любому из полноразмерных антител против MUC16, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую и легкую цепи полноразмерного антитела против MUC16. В некоторых вариантах осуществления каждая из одной или более последовательностей нуклеиновых кислот содержится в отдельном векторе. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере некоторые из последовательностей нуклеиновых кислот содержатся в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления все последовательности нуклеиновых кислот содержатся в одном и том же векторе. Векторы могут быть выбраны, например, из группы, состоящей из векторов экспрессии млекопитающих и вирусных векторов (таких как полученные из ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, герпесвирусов и лентивирусов).

**[0174]** Способы введения генов в клетку и их экспрессии в ней известны в данной области техники. В контексте вектора экспрессии вектор может быть легко введен в клетку-хозяина, например, клетку млекопитающего, бактериальную клетку, клетку дрожжей или клетку насекомых, с помощью любого способа, известного в данной области техники. Например, вектор экспрессии может быть перенесен в клетку-хозяина с помощью физических, химических или биологических средств.

**[0175]** Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение с фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т. п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. См., например, Green and Sambrook (2013, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). В некоторых вариантах

осуществления введение полинуклеотида в клетку-хозяина осуществляют путем трансфекции с фосфатом кальция.

**[0176]** Биологические способы введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяина включают использование ДНК- и РНК-векторов. Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, стали наиболее широко используемым способом вставки генов в клетки млекопитающих, например, человеческие клетки. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивируса, поксвирусов, вируса простого герпеса 1, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов, и т. п. См., например, патенты США № 5350674 и 5585362.

**[0177]** Химические средства для введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, такие как комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, гранулы и липидные системы, включая эмульсии «масло в воде», мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Иллюстративная коллоидная система для применения в качестве носителя для доставки *in vitro* и *in vivo* представляет собой липосому (например, искусственную мембранную везикулу).

**[0178]** В случае, когда используется невирусная система доставки, иллюстративным носителем для доставки является липосома. Для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*) предусмотрено применение липидных составов. Согласно еще одному аспекту нуклеиновая кислота может быть связана с липидом. Нуклеиновая кислота, связанная с липидом, может быть инкапсулирована в водную внутреннюю часть липосомы, внедрена в липидный бислой липосомы, присоединена к липосоме посредством связывающей молекулы, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захвачена в липосоме, связана в комплексе с липосомой, диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, объединена с липидом, может содержаться в виде суспензии в липиде, содержаться или быть связана в комплексе с мицеллой, или иным образом связана с липидом. Композиции, связанные с липидами, липидами/ДНК или липидами/векторами экспрессии, не ограничены какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в двухслойной структуре, в виде мицелл, или со «свернутой» структурой. Они также могут быть просто распределены в растворе, возможно, образуя агрегаты, которые не являются однородными по размеру

или форме. Липиды представляют собой жировые вещества, которые могут представлять собой природные или синтетические липиды. Например, липиды включают жировые капли, которые естественным образом содержатся в цитоплазме, а также класс соединений, содержащих длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминокислоты и альдегиды.

**[0179]** Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иного воздействия на клетку ингибитором согласно настоящему изобретению, для подтверждения присутствия рекомбинантной последовательности ДНК в клетке-хозяине могут быть проведены различные анализы. Такие анализы включают, например, «молекулярно-биологические» анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как южный и северный блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как обнаружение наличия или отсутствия определенного пептида, например, с помощью иммунологических средств (методы ELISA и вестерн-блоттинг) или с помощью анализов, описанных в настоящем документе для идентификации агентов входящих в объем изобретения.

**[0180] Получение агентов антител против MUC16 и компонентов антител против MUC16**

**[0181]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 представляет собой моноклональное антитело, или он получен из моноклонального антитела. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 содержит домены  $V_H$  и  $V_L$  или их варианты, полученные из моноклонального антитела. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 дополнительно содержит домены  $C_{H1}$  и  $C_L$  или их варианты, полученные из моноклонального антитела. Моноклональные антитела могут быть получены, например, с использованием известных методов в данной области техники, включая гибридные методы, методы фагового дисплея или с использованием методов, основанных на рекомбинантной ДНК. Кроме того, иллюстративные методы фагового дисплея описаны в настоящем документе и в приведенных ниже примерах.

**[0182]** В гибридном методе хомяк, мышь или другое подходящее животное-хозяина обычно иммунизируют иммунизирующим агентом для выработки

лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с иммунизирующим агентом. В качестве альтернативы, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Иммунизирующий агент может включать полипептид или слитый белок представляющего интерес белка. Как правило, лимфоциты периферической крови («PBL») используют, если желательны клетки человеческого происхождения, а клетки селезенки или клетки лимфатических узлов используют, если желательны источники, представляющие собой отличное от человека млекопитающее. Затем лимфоциты сливают с иммортализованной клеточной линией с использованием подходящего агента для слияния, такого как полиэтиленгликоль, с образованием гибридной клетки. Иммортализованные клеточные линии обычно представляют собой трансформированные клетки млекопитающих, в частности, клетки миеломы, происходящие от грызунов, крупного рогатого скота и человека. Обычно используют клеточные линии миеломы крыс или мышей. Гибридные клетки можно культивировать в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживаемость неслитых иммортализованных клеток. Например, если в родительских клетках отсутствует фермент гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом, как правило, будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин («среда ГАТ»), что предотвращает рост клеток, лишенных HGPRT.

**[0183]** В некоторых вариантах осуществления иммортализованные клеточные линии эффективно сливаются, поддерживают стабильную экспрессию антитела на высоком уровне выбранными клетками, продуцирующими антитело, и чувствительны к среде, такой как среда ГАТ. В некоторых вариантах осуществления иммортализованные клеточные линии представляют собой линии мышинной миеломы, которые могут быть получены, например, из Центра распределения клеток Института им. Солка, Сан-Диего, Калифорния, и Американской коллекции типовых культур, Манассас, Вирджиния. Для продукции моноклональных человеческих антител также были описаны клеточные линии человеческой миеломы и мышинной-человеческой гетеромиеломы.

**[0184]** Затем культуральная среда, в которой культивируются гибридные клетки, может быть проанализирована на наличие моноклональных антител, направленных против полипептида. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридными клетками, может быть определена с помощью иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммуноанализ (РИА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Такие методы и анализы известны в данной области техники. Аффинность связывания моноклонального антитела может быть определена, например, с помощью анализа Скэтчарда согласно Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

**[0185]** После идентификации желаемых гибридных клеток клоны могут быть субклонированы с помощью процедур предельного разведения и выращены стандартными способами. См. Goding, цитируемый выше. Подходящие культуральные среды для этой цели включают, например, среду Игла в модификации Дульбекко и среду RPMI-1640. В качестве альтернативы, гибридные клетки могут быть выращены *in vivo* в виде асцита у млекопитающего.

**[0186]** Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, могут быть выделены или очищены из культуральной среды или асцитной жидкости с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, белок А-сефароза, гидроксипатитная хроматография, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

**[0187]** В некоторых вариантах осуществления согласно любому из агентов антител против MUC16, описанных в настоящем документе, агент антитела против MUC16 содержит последовательности из клона, выбранного из библиотеки антител (такой как фаговая библиотека, представляющая фрагменты scFv или Fab). Клон может быть идентифицирован путем скрининга комбинаторных библиотек на фрагменты антител с желаемой активностью или активностями. Например, в данной области техники известен ряд способов создания библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек на антитела, обладающие желаемыми характеристиками связывания. Такие способы рассмотрены, например, в Hoogenboom *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2001) и дополнительно описаны, например, в McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628

(1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); и Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

**[0188]** В некоторых методах фагового дисплея репертуары генов  $V_H$  и  $V_L$  отдельно клонируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рекомбинируют случайным образом в фаговых библиотеках, которые затем могут быть подвергнуты скринингу на антигенсвязывающий фаг, как описано в Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Фаг обычно демонстрирует фрагменты антитела, либо в виде scFv-фрагментов, либо в виде Fab-фрагментов. Библиотеки из иммунизированных источников обеспечивают высокоаффинные антитела к иммуногену без необходимости конструирования гибридом. В качестве альтернативы, наивный репертуар может быть клонирован (например, от человека) для обеспечения единого источника антител к широкому спектру чужеродных, а также аутоантигенов без какой-либо иммунизации, как описано Griffiths *et al.*, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Наконец, наивные библиотеки также могут быть получены синтетически путем клонирования не подвергшихся реаранжировке сегментов V-гена из стволовых клеток и использования ПЦР-праймеров, содержащих случайную последовательность, для кодирования высоковариабельных областей CDR3 и осуществления реаранжировки *in vitro*, как описано Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Патентные публикации, описывающие фаговые библиотеки человеческих антител, включают, например: патент США 5750373 и публикации патентных заявок США № 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

**[0189]** Агенты антител против MUC16 могут быть получены с использованием фагового дисплея для скрининга библиотек на компоненты антител против MUC16, специфичных к MUC16-мишени (например, pMUC16). Библиотека может представлять собой библиотеку фагового дисплея человеческих scFv, имеющую разнообразие по меньшей мере  $1 \times 10^9$  (например, по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^9$ ,  $2,5 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $7,5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2,5 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $7,5 \times 10^{10}$  или  $1 \times 10^{11}$ ) уникальных

фрагментов человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления библиотека представляет собой наивную человеческую библиотеку, сконструированную из ДНК, экстрагированной из человеческих МНПК и селезенок от здоровых доноров, охватывающую все подсемейства человеческой тяжелой и легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления библиотека представляет собой наивную человеческую библиотеку, сконструированную из ДНК, экстрагированной из МНПК, выделенных от пациентов с различными заболеваниями, таких как пациенты с аутоиммунными заболеваниями, онкологические пациенты и пациенты с инфекционными заболеваниями. В некоторых вариантах осуществления библиотека представляет собой полусинтетическую человеческую библиотеку, где CDR3 тяжелой цепи полностью рандомизирована, причем все аминокислоты (за исключением цистеина) с одинаковой вероятностью присутствуют в любом отдельно взятом положении (см., например, Hoet, R.M. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 23(3):344-348, 2005). В некоторых вариантах осуществления CDR3 тяжелой цепи полусинтетической человеческой библиотеки имеет длину от приблизительно 5 до приблизительно 24 (например, приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления библиотека представляет собой полусинтетическую библиотеку фагового дисплея. В некоторых вариантах осуществления библиотека представляет собой библиотеку фагового дисплея нечеловеческого происхождения.

**[0190]** Фаговые клоны, которые связываются с MUC16-мишенями (например, nMUC16) с высокой аффинностью, могут быть отобраны путем итерационного связывания фага с MUC16-мишенью, связанным с твердой подложкой (такой как, например, гранулы для пэннинга в растворе или клетки млекопитающих для клеточного пэннинга), с последующим удалением несвязанного фага и элюированием специфически связанного фага. Связанные фаговые клоны затем элюируют и используют для инфицирования подходящей клетки-хозяина, такой как *E. coli* XL1-Blue, для экспрессии и очистки. В примере клеточного пэннинга клетки НЕК293, сверхэкспрессирующие MUC16 на клеточной поверхности, смешивают с фаговой библиотекой, после чего клетки собирают, а связанные клоны элюируют и используют для инфицирования подходящей клетки-хозяина для экспрессии и очистки (см.

примеры). Пэннинг может быть проведен в течение нескольких (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6 или более) раундов с пэннингом в растворе, клеточным пэннингом или их комбинацией для обогащения фаговыми клонами, специфически связывающимися с MUC16-мишенью. Обогащенные фаговые клоны могут быть протестированы на специфическое связывание с MUC16-мишенью с помощью любых методов, известных в данной области техники, включая, например, ELISA и FACS.

**[0191]** Моноклональные антитела также могут быть созданы методами, основанными на рекомбинантной ДНК, такими как описанные в патенте США № 4816567. ДНК, кодирующая моноклональные антитела согласно изобретению, может быть легко выделена и секвенирована с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител). Гибридомные клетки, как описано выше, или MUC16-специфичные фаговые клоны согласно изобретению могут служить источником такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые в иных обстоятельствах не продуцируют белок иммуноглобулина, для синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. ДНК также может быть модифицирована, например, путем замены кодирующей последовательностью человеческих константных доменов тяжелой и легкой цепи и/или каркасных областей гомологичных последовательностей нечеловеческого происхождения (патент США № 4816567; Morrison *et al.*, цитируемый выше) или путем ковалентного соединения с кодирующей последовательностью иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида. Такой неиммуноглобулиновый полипептид может быть замещен константными доменами агента антитела согласно изобретению или может быть замещен переменными доменами одного антиген-соединяющего сайта агента антитела согласно изобретению для создания агента химерного двухвалентного антитела.

**[0192]** Антитела могут представлять собой одновалентные антитела. Способы получения одновалентных антител известны в данной области техники. Например,

один из способов включает рекомбинантную экспрессию легкой цепи иммуноглобулина и модифицированной тяжелой цепи. Тяжелая цепь, как правило, усечена в любой точке Fc-области, чтобы предотвратить перекрестное сшивание тяжелой цепи. В качестве альтернативы, соответствующие остатки цистеина заменяют другим аминокислотным остатком или удаляют, чтобы предотвратить перекрестное сшивание.

**[0193]** Способы *in vitro* также подходят для получения одновалентных антител. Расщепление антител с получением их фрагментов, в частности, Fab-фрагментов, может быть осуществлено с использованием любого способа, известного в данной области техники.

**[0194]** Вариабельные домены антител с желаемой специфичностью связывания (антигенсвязывающие сайты антитела) могут быть слиты с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. Слияние предпочтительно осуществляют с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирной, CH2- и CH3-областей. В некоторых вариантах осуществления первая константная область тяжелой цепи (CH1), содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствует по меньшей мере в одном из слияний. ДНК, кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, при желании, легкой цепи иммуноглобулина, вставляют в отдельные экспрессионные векторы и котрансфицируют в подходящий организм-хозяин.

**[0195]** *Химерные и гуманизированные антитела*

**[0196]** Агенты антител против MUC16 (например, полноразмерные антитела против MUC16) или их антигенсвязывающий фрагмент могут представлять собой агенты гуманизированных антител или агенты человеческих антител. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышинных) компонентов антител представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv или другие антигенсвязывающие последовательности антител), которые обычно содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Гуманизированные компоненты антител включают человеческие иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (реципиентное

антитело), в которых остатки из CDR реципиента заменены остатками из CDR вида, отличного от человека (донорское антитело), такого как мышь, крыса или кролик, обладающей желаемой специфичностью, аффинностью и антигенсвязывающей способностью. В некоторых случаях остатки каркасной области Fv человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Гуманизированные компоненты антител также могут содержать остатки, которые не содержатся ни в реципиентном антителе, ни в импортных CDR или каркасных последовательностях. Как правило, гуманизированное антитело может содержать по существу все из по меньшей мере одного и как правило двух переменных доменов, в которых все или по существу все области CDR соответствуют таковым из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все области FR являются областями консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина.

**[0197]** Как правило, агент гуманизированного антитела имеет один или более аминокислотных остатков, введенных в него из источника нечеловеческого происхождения. Эти аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения часто называют «импортными» остатками, которые обычно взяты из «импортного» переменного домена. Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизация может быть по существу проведена согласно способу Winter и коллег (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), путем замены CDR грызунов или последовательностей CDR на соответствующие последовательности человеческого антитела. Соответственно, такие «гуманизированные» компоненты антител представляют собой компоненты антител (патент США № 4816567), в которых существенно меньшая область, чем интактный переменный человеческий домен, была заменена соответствующей последовательностью от вида, отличного от человека. На практике гуманизированные компоненты антител, как правило, представляют собой компоненты человеческих антител, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, некоторые остатки FR заменены остатками из аналогичных сайтов в антителах грызунов.

**[0198]** В качестве альтернативы гуманизации могут быть получены человеческие компоненты антител. Например, в настоящее время возможно создание трансгенных животных (например, мышей), которые способны после иммунизации продуцировать полный репертуар человеческих антител в отсутствие продукции эндогенных иммуноглобулинов. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена области соединения тяжелой цепи (JH) антитела у химерных мышей и мышей с мутацией зародышевой линии приводит к полному ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос генетической информации иммуноглобулина человеческой зародышевой линии таким мышам с мутацией зародышевой линии приведет к продукции человеческих антител при заражении антигеном. См., например, Jakobovits *et al.*, *PNAS USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); патенты США № 5545806, 5569825, 5591669, 5545807; и WO 97/17852. В качестве альтернативы, человеческие антитела могут быть получены путем введения локусов человеческого иммуноглобулина трансгенным животным, например, мышам, у которых эндогенные гены иммуноглобулина были частично или полностью инактивированы. При заражении наблюдается продукция человеческих антител, очень похожая на продукцию, наблюдаемую у людей, во всех отношениях, включая реаранжировку генов, сборку и репертуар антител. Этот подход описан, например, в патентах США № 5545807, 5545806, 5569825, 5625126, 5633425 и 5661016, и Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

**[0199]** Агенты человеческих антител также могут быть получены с помощью активированных *in vitro* В-клеток (см. патенты США № 5567610 и 5229275) или с использованием различных методов, известных в данной области техники, включая библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Методы согласно Cole *et al.* и Boerner *et al.* также подходят для получения моноклональных человеческих антител. Cole *et al.*,

*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991).

**[0200] Варианты агента антитела против MUC16**

**[0201]** В некоторых вариантах осуществления рассматриваются варианты аминокислотной последовательности агентов антитела против MUC16 (например, полноразмерного антитела против MUC16) или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенных в настоящем документе. Например, указанная модификация может быть желаемой для улучшения аффинности связывания и/или других биологических свойств агента антитела. Варианты аминокислотной последовательности агента антитела могут быть получены путем введения подходящих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую агент антитела, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях агента антитела. Могут быть осуществлены любые комбинации делеций, инсерций и замен для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками, например, связыванием антигена.

**[0202]** В некоторых вариантах осуществления предложены варианты агентов антител против MUC16, имеющие одну или более аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес для замещающего мутагенеза, включают области HVR и FR. Аминокислотные замены могут быть введены в представляющий интерес агент антитела и продукты могут быть подвергнуты скринингу на желаемую активность, например, сохранение/улучшение связывания антигена, снижение иммуногенности или улучшение АЗКЦ или КЗЦ.

**[0203]** Консервативные замены приведены в таблице 4 ниже.

**ТАБЛИЦА 4: КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЗАМЕНЫ**

<b>Исходный остаток</b>	<b>Примеры замен</b>	<b>Предпочтительные замены</b>
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln

Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

**[0204]** Аминокислоты могут быть сгруппированы в различные классы в соответствии с общими свойствами боковой цепи: гидрофобные: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; кислые: Asp, Glu; основные: His, Lys, Arg; остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и ароматические: Trp, Tyr, Phe. Неконсервативные замены включают замену члена одного из этих классов на другой класс.

**[0205]** Типичный вариант замены представляет собой агент антитела с созревшей аффинностью, который может быть легко получен, например, с использованием методов созревания аффинности на основе фагового дисплея. Вкратце, один или более остатков CDR мутируют, а варианты компоненты антител отображают на фаге и

подвергают скринингу на конкретную биологическую активность (например, аффинность связывания). Изменения (например, замены) могут быть сделаны в областях HVR, например, для улучшения аффинности антитела. Такие изменения могут быть сделаны в «горячих точках» HVR, т. е. остатках, кодируемых кодонами, которые претерпевают мутации с высокой частотой в процессе соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), и/или определяющих специфичность остатках (SDR), при этом полученный вариант V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> тестируют на аффинность связывания. Созревание аффинности путем конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек было описано, например, в Hoogenboom *et al.*, в *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).)

**[0206]** В некоторых вариантах осуществления созревания аффинности разнообразие вводят в переменные гены, выбранные для созревания, любым из ряда различных способов (например, ПЦР с ошибками, перестановка цепей или олигонуклеотид-направленный мутагенез). Затем создается вторичная библиотека. Затем библиотеку подвергают скринингу для идентификации любых вариантов агента антитела с желаемой аффинностью. Другой способ введения разнообразия включает HVR-направленные подходы, в которых рандомизируют несколько остатков HVR (например, 4-6 остатков за раз). Остатки HVR, участвующие в связывании антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, с использованием мутагенеза со сканированием аланина или моделирования. В частности, мишенями часто выступают CDR-H3 и CDR-L3.

**[0207]** В некоторых вариантах осуществления в одной или более HVR могут иметь место замены, инсерции или делеции, если такие модификации по существу не снижают способность агента антитела связывать антиген. Например, в HVR могут быть сделаны консервативные модификации (например, консервативные замены, как предложено в настоящем документе), которые по существу не снижают аффинность связывания. Такие модификации могут быть за пределами «горячих точек» HVR или SDR. В некоторых вариантах осуществления вариантных последовательностей V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, предложенных выше, каждая HVR либо является немодифицированной, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

**[0208]** Подходящий способ идентификации остатков или областей агента антитела, которые могут выступать мишенью для мутагенеза, называется «мутагенезом со сканированием аланина», как описано Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. В этом способе остаток или группу целевых остатков (например, заряженных остатков, таких как arg, asp, his, lys и glu) идентифицируют и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином) для определения того, влияет ли это на взаимодействие агента антитела с антигеном. В местах расположения аминокислот, демонстрирующих функциональную чувствительность к исходным заменам, могут быть введены дополнительные замены. В качестве альтернативы или дополнительно, для идентификации контактных точек между антителом и антигеном может быть определена кристаллическая структура комплекса антиген-антитело. Такие контактные остатки и соседние остатки могут выступать мишенями или быть удалены в качестве кандидатов для замены. Варианты могут быть подвергнуты скринингу для определения того, обладают ли они желаемыми свойствами.

**[0209]** Инсерции аминокислотной последовательности включают амино- и/или карбоксиконцевые слияния длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также инсерции одного или нескольких аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры концевых инсерций включают агент антитела с N-концевым остатком метионила. Другие инсерционные варианты молекулы агента антитела включают слияние N- или C-конца агента антитела с ферментом (например, для ADEPT) или полипептидом, который увеличивает период полувыведения агента антитела из сыворотки.

**[0210]** *Варианты Fc-области*

**[0211]** В некоторых вариантах осуществления в Fc-область агента антитела (например, полноразмерного антитела против MUC16 или слитого белка Fc против MUC16), предложенного в настоящем документе, могут быть введены одна или более аминокислотных модификаций с образованием тем самым варианта Fc-области. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc-области имеет усиленную эффекторную функцию АЗКЦ, часто связанную со связыванием с Fc-рецепторами (FcR). В некоторых вариантах осуществления вариант Fc-области имеет сниженную

эффекторную функцию АЗКЦ. Существует множество примеров изменений или мутаций последовательностей Fc, которые могут изменять эффекторную функцию. Например, в WO 00/42072 и Shields *et al.*, *J Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001) описаны варианты антител с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR. Содержание этих публикаций специально включено в настоящий документ посредством ссылки.

**[0212]** Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (АЗКЦ) представляет собой механизм действия терапевтических антител против опухолевых клеток. АЗКЦ представляет собой опосредованную клетками иммунную защиту, посредством которой эффекторная клетка иммунной системы активно осуществляет лизис клетки-мишени (например, раковой клетки), антигены поверхности мембраны которой связаны специфическими антителами (например, антителом против MUC16). Типичная АЗКЦ включает активацию NK-клеток антителами. NK-клетка экспрессирует CD16, который представляет собой Fc-рецептор. Этот рецептор распознает Fc-часть антитела, связанного с поверхностью клетки-мишени, и связывается с ней. Наиболее распространенный Fc-рецептор на поверхности NK-клетки называется CD16 или FcγRIII. Связывание Fc-рецептора с Fc-областью антитела приводит к активации NK-клеток, высвобождению цитолитических гранул и последующему апоптозу клеток-мишеней. Вклад АЗКЦ в уничтожение опухолевых клеток может быть измерен с помощью специфического теста, в котором используются клетки NK-92, которые были трансфицированы высокоаффинным FcR. Результаты сравнивают с клетками NK-92 дикого типа, не экспрессирующими FcR.

**[0213]** В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен вариант агента антитела против MUC16 (такой как вариант полноразмерного антитела против MUC16), содержащий Fc-область, которая обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает ее желательным кандидатом для применений, в которых важен период полувыведения агента антитела против MUC16 *in vivo*, а некоторые эффекторные функции (такие как КЗЦ и АЗКЦ) являются ненужными или пагубными. Анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* могут быть проведены для подтверждения снижения/истощения активностей КЗЦ и/или АЗКЦ. Например, могут быть проведены анализы связывания Fc-рецептора (FcR), чтобы убедиться, что агент антитела не обладает связыванием FcγR (следовательно, вероятно, не обладает

активностью АЗКЦ), но сохраняет способность связывания FcRn. Основные клетки для опосредования АЗКЦ, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках обобщена в таблице 3 на стр. 464 источника Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5500362 (см., например, Hellstrom, I. *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom, I *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); патенте США № 5821337 (см. Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). В качестве альтернативы, могут быть использованы нерадиоактивные методы анализа (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТИ™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc., Маунтин-Вью, Калифорния); и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96™ (Promega, Мадисон, Висконсин). Подходящие для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) и естественные киллеры (NK-клетки). В качестве альтернативы или дополнительно, активность АЗКЦ представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой как раскрытая в Clynes *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Также могут быть проведены анализы связывания C1q для подтверждения того, что агент антитела неспособен связывать C1q и, следовательно, не обладает активностью КЗЦ. См., например, ELISA связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента может быть проведен анализ КЗЦ (см., например, Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M. S. *et al.*, *Blood* 101:1045-1052 (2003); и Cragg, M. S. and M. J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Определение связывания FcRn и клиренса/периода полувыведения *in vivo* также могут быть проведены с использованием способов, известных в данной области техники (см., например, Petkova, S. B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

**[0214]** Антитела со сниженной эффекторной функцией включают антитела с заменой одного или более из остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 Fc-области (патент США № 6737056). Такие мутанты Fc включают мутанты Fc с заменами при двух или более аминокислотных положениях из 265, 269, 270, 297 и 327, включая так

называемый мутант Fc «DANA» с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7332581).

**[0215]** Описаны некоторые варианты агента антитела с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR (см., например, патент США № 6737056; WO 2004/056312 и Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

**[0216]** В некоторых вариантах осуществления предложен вариант агента антитела против MUC16 (такого как полноразмерное антитело против MUC16), содержащий вариантную Fc-область, содержащую одну или более аминокислотных замен, улучшающих АЗКЦ. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен, улучшающих АЗКЦ, причем замены находятся в положениях 298, 333 и/или 334 вариантной Fc-области (нумерация остатков согласно EU). В некоторых вариантах осуществления вариант агента антитела против MUC16 (например, полноразмерного антитела против MUC16) содержит следующую аминокислотную замену в своей вариантной Fc-области: S298A, E333A и K334A.

**[0217]** В некоторых вариантах осуществления в Fc-область вносят модификации, которые приводят к изменению (т. е. либо улучшению, либо уменьшению) связывания C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ), например, как описано в патенте США № 6194551, WO 99/51642 и Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

**[0218]** В некоторых вариантах осуществления предложен вариант агента антитела против MUC16 (такого как полноразмерное антитело против MUC16), содержащий вариантную Fc-область, содержащую одну или более аминокислотных замен, которые увеличивают период полувыведения и/или улучшают связывание с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Антитела с увеличенными периодами полувыведения и улучшенным связыванием с FcRn описаны в US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Эти антитела содержат Fc-область с одной или более заменами в ней, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Такие варианты Fc включают варианты с заменами в одном или более из следующих остатков Fc-области: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, заменой остатка 434 Fc-области (патент США № 7371826).

[0219] Другие примеры вариантов Fc-области см. также в Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821; и WO 94/29351.

[0220] Рассматриваются агенты антител против MUC16 (такие как полноразмерные антитела против MUC16), содержащие любой из вариантов Fc, описанных в настоящем документе, или их комбинации.

[0221] **Варианты гликозирования**

[0222] В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 (такой как полноразмерное антитело против MUC16) или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, модифицированы для увеличения или уменьшения степени гликозирования агента антитела против MUC16. Добавление или удаление сайтов гликозирования в агенте антитела против MUC16 может быть легко осуществлено путем модификации аминокислотной последовательности агента антитела против MUC16 или его полипептидной части таким образом, что создается или удаляется один или более сайтов гликозирования.

[0223] Если агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc-область, то присоединенный к нему углевод может быть модифицирован. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный, биантенарный олигосахарид, который обычно присоединен N-связью к Asn297 CH2-домена Fc-области. См., например, Wright *et al.*, *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Олигосахарид может включать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в «стебле» биантенарной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления могут быть сделаны модификации олигосахарида в агенте антитела против MUC16 согласно изобретению для создания вариантов агента антитела против MUC16 с определенными улучшенными свойствами.

[0224] N-гликаны, присоединенные к CH2-домену Fc, являются неоднородными. Антитела или слитые белки Fc, генерируемые в клетках CHO, фукозилируют активностью фукозилтрансферазы. См. Shoji-Hosaka *et al.*, *J. Biochem.* 140:777- 83 (2006). Обычно небольшой процент встречающихся в природе афукозилированных IgG может быть обнаружен в сыворотке крови человека. N-гликозильрование Fc важно для связывания с FcγR; и афукозилирование N-гликана повышает связывающую

способность Fc по отношению к FcγRIIIa. Повышенное связывание FcγRIIIa может усиливать АЗКЦ, что может быть выгодно при некоторых терапевтических применениях агента антитела, где желательна цитотоксичность.

**[0225]** В некоторых вариантах осуществления усиленная эффекторная функция может быть неблагоприятной, когда Fc-опосредованная цитотоксичность нежелательна. В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент или CH2-домен не является гликозилированным. В некоторых вариантах осуществления сайт N-гликозилирования в CH2-доме мутирован для предотвращения гликозилирования.

**[0226]** В некоторых вариантах осуществления предложены варианты агента антитела против MUC16 (такого как полноразмерное антитело против MUC16), содержащие Fc-область, в которой углеводная структура, присоединенная к Fc-области, имеет пониженное содержание фукозы или не содержит фукозы, что может улучшить функцию АЗКЦ. В частности, в настоящем документе рассматриваются агенты антител против MUC16, которые имеют пониженное содержание фукозы по сравнению с количеством фукозы на том же агенте антитела против MUC16, продуцируемом в клетке CHO дикого типа. То есть, они характеризуются меньшим количеством фукозы, чем они имели бы в противном случае, если бы продуцировались нативными клетками CHO (например, клеткой CHO, продуцирующей нативный паттерн гликозилирования, такой как клетка CHO, содержащая нативный ген FUT8). В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 представляет собой агент, в котором менее чем приблизительно 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5% N-связанных гликанов на нем содержат фукозу. Например, количество фукозы в таком агенте антитела против MUC16 может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 представляет собой агент, в котором ни один из N-связанных гликанов на нем не содержит фукозу, то есть, где агент антитела против MUC16 полностью не содержит фукозы, или не имеет фукозы, или является афукозилированным. Количество фукозы определяют путем расчета среднего количества фукозы в сахарной цепи при Asn297 относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, сложных, гибридных и высокоманнозных структур), согласно масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297

относится к остатку аспарагина, расположенному примерно в положении 297 в Fc-области (нумерация остатков Fc-области согласно EU); однако Asn297 также может быть расположен приблизительно на  $\pm 3$  аминокислоты выше или ниже относительно положения 297, т. е. между положениями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности антител. Такие варианты фукозилирования могут иметь улучшенную функцию АЗКЦ. См., например, публикации патентных заявок США US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «фукозодефицитным» вариантам агентов антител, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al.*, *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO с недостатком фукозилирования белка (Ripka *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); патентная заявка США US 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, в особенности пример 11), и нокаутные клеточные линии, такие как клетки CHO с нокаутом гена  $\alpha$ -1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (см., например, Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); и WO2003/085107).

**[0227]** Варианты агента антитела против MUC16 (такого как полноразмерное антитело против MUC16) дополнительно обеспечены разделенными на две части олигосахаридами, например, в которых биантенарный олигосахарид, присоединенный к Fc-области агента антитела против MUC16, разделен на две части посредством GlcNAc. Такие варианты агента антитела против MUC16 (такого как полноразмерное антитело против MUC16) могут иметь сниженное фукозилирование и/или улучшенную функцию АЗКЦ. Примеры таких вариантов агента антитела описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); патенте США № 6602684 (Umana *et al.*); US 2005/0123546 (Umana *et al.*) и Ferrara *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering*, 93(5): 851-861 (2006). Также предложены варианты агента антитела против MUC16 (такого как

полноразмерное антитело против MUC16) с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области. Такие варианты агента антитела против MUC16 могут иметь улучшенную функцию КЗЦ. Такие варианты агента антитела описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); и WO 1999/22764 (Raju, S.).

**[0228]** В некоторых вариантах осуществления варианты агента антитела против MUC16 (такого как полноразмерное антитело против MUC16), содержащие Fc-область, способны связываться с FcγRIII. В некоторых вариантах осуществления варианты агента антитела против MUC16 (такого как полноразмерное антитело против MUC16), содержащие Fc-область, обладают активностью АЗКЦ в присутствии эффекторных человеческих клеток человека (например, Т-клеток) или обладают повышенной активностью АЗКЦ в присутствии эффекторных человеческих клеток по сравнению с тем же агентом антитела против MUC16 (таким как полноразмерное антитело против MUC16), содержащим Fc-область человеческого IgG1 дикого типа.

**[0229]** *Сконструированные варианты с цистеином*

**[0230]** В некоторых вариантах осуществления может быть желательно создать сконструированные с цистеином агенты антител против MUC16 (такие как полноразмерное антитело против MUC16) или его антигенсвязывающий фрагмент, в которых один или более аминокислотных остатков заменены остатками цистеина. В некоторых вариантах осуществления замененные остатки содержатся в доступных сайтах агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента. При замене этих остатков цистеином реакционноспособные тиольные группы располагаются в доступных сайтах агента антитела против MUC16 и могут быть использованы для конъюгирования агента антитела против MUC16 с другими компонентами, такими как компоненты лекарственного средства или компоненты линкер-лекарственное средство, для создания иммуноконъюгата против MUC16, как описано далее в настоящем документе. Сконструированные с цистеином агенты против MUC16 (такие как антитела против MUC16, например, полноразмерные антитела против MUC16) могут быть получены, как описано, например, в патенте США № 7521541.

**[0231]** *Производные*

**[0232]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 (такой как полноразмерное антитело против MUC16) или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, могут быть дополнительно модифицированы таким образом, чтобы они содержали дополнительные небелковые компоненты, которые известны в данной области техники и легко доступны. Компоненты, подходящие для дериватизации агента антитела против MUC16, включают, не ограничиваясь перечисленным, водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, не ограничиваясь перечисленным, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (гомополимеры или случайные сополимеры) и декстран или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Пропиональдегидполиэтиленгликоля может иметь преимущества в производстве благодаря его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к агенту антитела против MUC16, может варьировать, и если присоединено более одного полимера, они могут представлять собой одинаковые или разные молекулы. В целом, количество и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, могут быть определены на основании соображений, включая, не ограничиваясь перечисленным, конкретные свойства или функции агента антитела против MUC16, подлежащие улучшению, будет ли производное агента антитела против MUC16 использоваться в терапии при определенных условиях и т. д.

**[0233]** В некоторых вариантах осуществления предложены конъюгаты агента антитела против MUC16 (такого как полноразмерное антитело против MUC16) или его антигенсвязывающего фрагмента и небелкового компонента, которые могут быть селективно нагреты путем воздействия излучения. В некоторых вариантах осуществления небелковый компонент представляет собой углеродную нанотрубку (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). Излучение может иметь

любую длину волны и включает, не ограничиваясь перечисленным, длины волн, которые не наносят вреда обычным клеткам, но которые нагревают небелковый компонент до температуры, при которой клетки, расположенные вблизи агента антитела против MUC16-небелкового компонента, погибают.

**[0234]** *Конъюгаты антител*

**[0235]** В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложены конъюгаты агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающих фрагментов, где указанный агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающие фрагменты конъюгированы с одним или более агентами, например, визуализирующим агентом или цитотоксическим агентом. В настоящем документе также предложены конъюгаты биспецифических антител, где указанное биспецифическое антитело конъюгировано с одним или более агентами, например, визуализирующим агентом или цитотоксическим агентом. В настоящем документе также предложены конъюгаты тяжелой цепи антитела, где указанная тяжелая цепь антитела конъюгирована с одним или более агентами, например, визуализирующим агентом или цитотоксическим агентом. В настоящем документе также предложены конъюгаты легкой цепи антитела, где указанная легкая цепь антитела конъюгирована с одним или более агентами, например, визуализирующим агентом или цитотоксическим агентом. В настоящем документе также предложены конъюгаты слитого белка, где указанный слитый белок конъюгирован с агентом, например, визуализирующим агентом или цитотоксическим агентом. В отдельных вариантах осуществления агент конъюгирован ковалентно или нековалентно.

**[0236]** В отдельных вариантах осуществления визуализирующий агент представляет собой детектируемую метку, такую как хромогенный, ферментный, радиоизотопный, изотопный, флуоресцентный, токсичный, хемилюминесцентный агент, контрастный агент для ядерного магнитного резонанса, или другую метку.

**[0237]** Неограничивающие примеры подходящих хромогенных меток включают диаминобензидин и 4-гидроксиазобензол-2-карбоновую кислоту.

**[0238]** Неограничивающие примеры подходящих ферментных меток включают малатдегидрогеназу, стафилококковую нуклеазу, дельта-5-стероидизомеразу, дрожжевую алкогольдегидрогеназу, альфа-глицеринфосфатдегидрогеназу,

триозофосфатизомеразу, пероксидазу, щелочную фосфатазу, аспарагиназу, глюкоза-оксидазу, бета-галактозидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназу, глюкоамилазу и ацетилхолинэстеразу.

**[0239]** Подходящие радиоизотопы хорошо известны специалистам в данной области техники и включают бета-излучатели, гамма-излучатели, позитронные излучатели и рентгеновские излучатели. Примеры подходящих радиоизотопных меток включают  $^3\text{H}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{57}\text{To}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{217}\text{Ci}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{109}\text{Pd}$ . В отдельных вариантах осуществления  $^{111}\text{In}$  представляет собой предпочтительный изотоп для визуализации *in vivo*, поскольку он позволяет избежать проблемы дегалогенирования  $^{125}\text{I}$ - или  $^{131}\text{I}$ -меченых агентов антител против MUC16 или их антигенсвязывающих фрагментов в печени. Кроме того,  $^{111}\text{In}$  обладает более предпочтительной для визуализации энергией гамма-излучения (Perkins et al, *Eur. J. Nucl. Med.* 70:296-301 (1985); Carasquillo et al, *J. Nucl. Med.* 25:281-287 (1987)). Например, для  $^{111}\text{In}$ , сопряженного с моноклональными антителами с 1-(Р-изотиоцианатбензил)-DPTA, наблюдается слабое поглощение неопухолевыми тканями, в частности, печенью, и, следовательно, усиление специфичности опухолевой локализации (Esteban et al., *J. Nucl. Med.* 28:861-870 (1987)).

**[0240]** Неограничивающие примеры подходящих нерадиоактивных изотопных меток включают  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{162}\text{Dy}$ ,  $^{52}\text{Tl}$  и  $^{56}\text{Fe}$ .

**[0241]** Неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных меток включают метку  $^{152}\text{Eu}$ , флуоресцеиновую метку, изотиоцианатную метку, родаминовую метку, фикоэритринную метку, фикоцианиновую метку, аллофикоцианиновую метку, метку зеленого флуоресцентного белка (GFP), о-фталальдегидную метку и флуорескаминановую метку.

**[0242]** Неограничивающие примеры хемилюминесцентных меток включают люминоловую метку, изолюминоловую метку, метку ароматического сложного эфира акридина, имидазольную метку, метку соли акридина, метку сложного эфира оксалата, люциферинную метку, люциферазную метку и эквориновую метку.

**[0243]** Неограничивающие примеры контрастных агентов для ядерного магнитного резонанса включают ядра тяжелых металлов, таких как Gd, Mn и железо.

**[0244]** Методы, известные специалисту в данной области техники для конъюгирования описанных выше меток с указанными агентами антител против MUC16 или их антигенсвязывающими фрагментами, биспецифическими антителами, тяжелыми цепями антител, легкими цепями антител и слитыми белками, описаны, например, в Kennedy et al., Clin. Chim. Acta 70: 1-31 (1976), и Schurs et al, Clin. Chim. Acta 81 : 1-40 (1977). Указанные в последнем источнике методы связывания представляют собой глутаральдегидный способ, периодатный способ, дималеимидный способ, способ с м-малеимидобензил-N-гидроксисукцинимидным сложным эфиром, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

**[0245]** Неограничивающие примеры цитотоксических агентов включают цитостатический или цитолитический агент, ион радиоактивного металла, например, альфа-излучатели, и токсины, например, экзотоксин синегнойной палочки, абрин, холерный токсин, рицин А и дифтерийный токсин.

**[0246]** В отдельных вариантах осуществления агент представляет собой диагностический агент. Диагностический агент представляет собой агент, применимый для диагностики или обнаружения заболевания путем локализации клеток, содержащих антиген. Подходящие диагностические агенты включают, не ограничиваясь перечисленным, радиоизотопы, красители (такие как красители с комплексом биотин-стрептавидин), контрастные агенты, флуоресцентные соединения или молекулы и энхансеры (например, парамагнитные ионы) для магнитно-резонансной томографии (МРТ). В патенте США № 6331175, который полностью включен посредством ссылки, описан метод МРТ и получение антител, конъюгированных с энхансером для МРТ. Предпочтительно диагностические агенты выбраны из группы, состоящей из радиоизотопов, энхансеров для применения в магнитно-резонансной томографии и флуоресцентных соединений. Для нагрузки агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента радиоактивными металлами или парамагнитными ионами может потребоваться проведение его реакции с реагентом, имеющим длинный хвост, к которому присоединено множество хелатирующих групп для связывания ионов. Такой хвост может представлять собой полимер, такой как полилизин, полисахарид или другую дериватизированную или поддающуюся дериватизации цепь, имеющую боковые

группы, с которыми могут связываться хелатирующие группы, такие как, например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА), порфирины, полиамины, краун-эфир, бис-тиосемикарбазоны, полиоксимы и подобные группы, которые, как известно, являются применимыми для этой цели. Хелаты могут быть соединены с антителами с использованием стандартных методов синтеза. Хелат обычно соединяют с антителом с помощью группы, которая обеспечивает возможность образования связи с молекулой с минимальной потерей иммунореактивности и минимальной агрегацией и/или внутренним перекрестным связыванием. Другие, более необычные способы и реагенты для конъюгирования хелатов с антителами описаны в патенте США № 4824659, авт. Hawthorne, под названием «Конъюгаты антител», выданном 25 апреля 1989 г., содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Особенно подходящие комбинации металл-хелат включают 2-бензил-ДТПА и его монометильные и циклогексильные аналоги, используемые с диагностическими изотопами для радиовизуализации. Эти же хелаты при объединении в комплекс с нерадиоактивными металлами, такими как марганец, железо и гадолиний, применимы для МРТ при использовании наряду с агентом антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе.

**[0247]** Макроциклические хелаты, такие как NOTA, DOTA и TETA, применяются с разнообразными металлами и радиоактивными металлами, в особенности с радионуклидами галлия, иттрия и меди, соответственно. Такие комплексы металл-хелат могут быть сделаны очень стабильными путем подгонки размера кольца к представляющему интерес металлу. Также рассматриваются другие хелаты кольцевого типа, такие как макроциклические полиэфиры, которые представляют интерес для стабильно связывающихся нуклидов, таких как  $^{223}\text{Ra}$ , для радиоиммунотерапии (RAIT).

**[0248] Фармацевтические композиции**

**[0249]** Также в настоящем документе предложены композиции (такие как фармацевтические композиции, также называемые в настоящем документе препаратами), содержащие агент антитела против MUC16 (такой как полноразмерное антитело против MUC16) или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую

кислоту, кодирующую агент антитела, вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую агент антитела, или клетку-хозяина, содержащую указанные нуклеиновую кислоту или вектор. В некоторых вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая агент антитела против MUC16 и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

**[0250]** Подходящие препараты агентов антител против MUC16 (таких как антитела против MUC16, например, полноразмерные антитела против MUC16) или их антигенсвязывающего фрагмента получают путем смешивания агента антитела против MUC16, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в виде лиофилизированных препаратов или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Иллюстративные препараты описаны в заявке WO98/56418, в явном виде включенной в настоящий документ посредством ссылки. Лيوфилизированные препараты, адаптированные для подкожного введения, описаны в WO97/04801. Такие лиофилизированные препараты

могут быть восстановлены подходящим разбавителем до высокой концентрации белка, и восстановленный препарат может быть подкожно введен индивидууму, подлежащему лечению в настоящем документе. Для доставки агентов антитела против MUC16 согласно настоящему изобретению в клетки могут быть использованы липофектины или липосомы.

**[0251]** Препарат в настоящем документе может также содержать одно или более активных соединений в дополнение к агенту антитела против MUC16 (такому как полноразмерное антитело против MUC16) или его антигенсвязывающему фрагменту, если это необходимо для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно обладающих комплементарными активностями, которые не оказывают неблагоприятного влияния друг на друга. Например, может быть желательно дополнительно обеспечить противоопухолевый агент, агент, ингибирующий рост, цитотоксический агент или химиотерапевтический агент в дополнение к агенту антитела против MUC16 или его антигенсвязывающему фрагменту. Такие молекулы соответствующим образом присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для предполагаемого назначения. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества агента антитела против MUC16, присутствующего в препарате, типа заболевания или расстройства, подлежащего лечению, и других факторов, рассмотренных выше. Как правило, их применяют в тех же дозировках и с теми же способами введения, как описано в настоящем документе, или в размере приблизительно от 1 до 99% ранее применявшихся дозировок.

**[0252]** Агенты антитела против MUC16 (такие как антитела против MUC16, например, полноразмерные антитела против MUC16) или их антигенсвязывающий фрагмент также могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозных или желатиновых микрокапсулах и поли(метилметакрилатных) микрокапсулах, соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением.

**[0253]** Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением агентов антител против MUC16 (таких как антитела против MUC16, например, полноразмерные антитела против MUC16) или их антигенсвязывающего фрагмента. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие агент антитела (или его фрагмент), матрицы которых находятся в форме формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и лейпролида ацетата) и поли-D(-)-3-гидроксимасляная кислота. В то время как полимеры, такие как этиленвинилацетат и сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты, обеспечивают высвобождение молекул в течение более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Когда инкапсулированные агенты антител остаются в организме в течение длительного времени, они могут денатурироваться или агрегироваться в результате воздействия влаги при 37 °C, что приводит к потере биологической активности и возможным изменениям иммуногенности. Могут быть разработаны рациональные стратегии стабилизации агентов антител против MUC16 в зависимости от задействованного механизма. Например, если обнаружено, что механизм агрегации представляет собой образование межмолекулярной связи S-S посредством тиол-дисульфидного обмена, стабилизация может быть достигнута путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, контроля содержания влаги, использования соответствующих добавок и разработки определенных композиций полимерных матриц.

**[0254]** В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 (такой как полноразмерное антитело против MUC16) или его антигенсвязывающий фрагмент включен в состав препарата с буфером, содержащим цитрат, NaCl, ацетат, сукцинат,

глицин, полисорбат 80 (Tween 80) или любую комбинацию вышеперечисленного. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент включен в состав препарата с буфером, содержащим от приблизительно 100 мМ до приблизительно 150 мМ глицина. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент включен в состав препарата с буфером, содержащим от приблизительно 50 мМ до приблизительно 100 мМ NaCl. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент включен в состав препарата с буфером, содержащим от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ ацетата. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент включен в состав препарата с буфером, содержащим от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ сукцината. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент включен в состав препарата с буфером, содержащим от приблизительно 0,005% до приблизительно 0,02% полисорбата 80. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент включен в состав препарата с буфером, имеющим pH приблизительно от 5,1 до 5,6. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент включен в состав препарата с буфером, содержащим 10 мМ цитрата, 100 мМ NaCl, 100 мМ глицина и 0,01% полисорбата 80, где препарат имеет pH 5,5.

**[0255]** Препараты, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко достигается, например, путем фильтрации через мембраны для стерилизующей фильтрации.

### **Способы лечения с использованием агентов антител против MUC16**

**[0256]** В отдельных вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы лечения рака у субъекта, в частности, MUC16-положительного рака у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в терапевтически эффективной дозе, такой как доза, описанная в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в соответствии со способом, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с одним или более дополнительными фармацевтически активными агентами.

**[0257]** Для применения агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента у субъекта конкретного вида используют агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с MUC16 этого конкретного вида. Например, для лечения человека используют агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с человеческим MUC16. В некоторых вариантах осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой иммуноглобулин.

**[0258]** Кроме того, для применения агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента у субъекта конкретного вида указанный агент антитела против MUC16, предпочтительно, константная область агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента, получен из этого конкретного вида. Например, для лечения человека агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, который представляет собой иммуноглобулин, где иммуноглобулин содержит человеческую константную область. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

**[0259]** В некоторых вариантах осуществления MUC16-положительный рак представляет собой рак яичника, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак фаллопиевой трубы, рак матки (например, эндометрия), первичный рак брюшины или рак любой другой ткани, экспрессирующей рецептор MUC16.

**[0260]** В некоторых вариантах осуществления лечение может быть направлено на достижение благоприятных или желаемых клинических результатов, включая, не ограничиваясь перечисленным, облегчение симптома, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) течения заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, смягчение или временное

облегчение течения заболевания и ремиссию (частичную или полную), будь то поддающаяся обнаружению или не поддающаяся обнаружению. В конкретном варианте осуществления «лечение» также может быть направлено на продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. В некоторых вариантах осуществления введение агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, субъекту с раком (например, раком яичника, раком легкого, раком поджелудочной железы, раком молочной железы, раком фаллопиевой трубы, раком матки (например, эндометрия) или первичным раком брюшины, или раком любой другой ткани, экспрессирующей рецептор MUC16) обеспечивает по меньшей мере один, два, три, четыре или более из следующих эффектов: (i) уменьшение или облегчение тяжести одного или более симптомов рака; (ii) уменьшение продолжительности одного или более симптомов, связанных с раком; (iii) предупреждение рецидива симптома, связанного с раком; (iv) сокращение госпитализации субъекта; (v) уменьшение продолжительности госпитализации; (vi) увеличение выживаемости субъекта; (vii) усиление или улучшение терапевтического эффекта другой терапии; (viii) ингибирование развития или манифестации одного или более симптомов, связанных с раком; (ix) уменьшение количества симптомов, связанных с раком; (x) улучшение качества жизни, оцениваемое способами, хорошо известными в данной области техники; (xi) ингибирование рецидива опухоли; (xii) регрессия опухолей и/или одного или более симптомов, связанных с ними; (xiii) ингибирование прогрессирования опухолей и/или одного или более симптомов, связанных с ними; (xiv) уменьшение роста опухоли; (xv) уменьшение размера опухоли (например, объема или диаметра); (xvi) уменьшение образования новообразованной опухоли; (xvii) предупреждение, ликвидация, удаление или контроль первичных, региональных и/или метастатических опухолей; (xviii) уменьшение количества или размера метастазов; (xix) снижение смертности; (xx) увеличение безрецидивной выживаемости; (xxi) размер опухоли сохраняется и не увеличивается или увеличивается менее чем на увеличение опухоли после введения стандартной терапии, согласно измерению традиционными способами, доступными специалисту в данной области техники, такими как магнитно-резонансная томография

(МРТ), МРТ с динамическим контрастным усилением (DCE-МРТ), рентгенография и компьютерная томография (КТ) или позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ); и/или (xxi) увеличение продолжительности ремиссии у пациентов. Лечение также может быть направлено на достижение одного или более из вышеперечисленного.

#### **Диагностические применения**

**[0261]** В отдельных вариантах осуществления агенты антител против MUC16 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут применяться в диагностических целях для обнаружения, диагностики или мониторинга состояния, описанного в настоящем документе (например, состояния, связанного с MUC16-положительными раковыми клетками). В отдельных вариантах осуществления агенты антител против MUC16 или их антигенсвязывающие фрагменты для применения в диагностических целях являются мечеными.

**[0262]** В отдельных вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы обнаружения состояния, описанного в настоящем документе, включающие (a) анализ экспрессии MUC16 или его фрагмента в клетках или образце ткани субъекта с использованием одного или более агентов антитела против MUC16 или его антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе; и (b) сравнение уровня экспрессии MUC16 или его фрагмента с контрольным уровнем, например, уровнями в образцах нормальной ткани (например, от субъекта, не имеющего состояния, описанного в настоящем документе, или от того же пациента до манифестации состояния), в результате чего увеличение или уменьшение анализируемого уровня экспрессии MUC16 или его фрагмента по сравнению с контрольным уровнем экспрессии MUC16 или его фрагмента указывает на состояние, описанное в настоящем документе.

**[0263]** Антитела, описанные в настоящем документе, могут применяться для анализа уровней MUC16 или его фрагмента в биологическом образце с использованием классических иммуногистологических методов, описанных в настоящем документе или известных специалистам в данной области техники (например, см. Jalkanen *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); и Jalkanen *et al.*, *J. Cell. Biol.* 105:3087-3096 (1987)). Другие методы на основе антител, применимые для обнаружения экспрессии генов белков включают иммуноанализы, такие как

твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммуноанализ (РИА). Подходящие метки для анализа на основе антител известны в данной области техники и включают ферментные метки, такие как глюкооксидаза, радиоизотопы, такие как иод ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ), углерод ( $^{14}\text{C}$ ), сера ( $^{35}\text{S}$ ), тритий ( $^3\text{H}$ ), индий ( $^{121}\text{In}$ ) и технеций ( $^{99}\text{Tc}$ ); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин, родамин и биотин. В некоторых вариантах осуществления аналитические метки конъюгированы с агентами антител против MUC16 или их антигенсвязывающими фрагментами, предложенными в настоящем документе, для непосредственного обнаружения. В некоторых вариантах осуществления аналитические метки конъюгированы со вторичным антителом, которое связывается с агентами антитела против MUC16 или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенными в настоящем документе. Тип вторичного антитела выбирают в соответствии с классом первичного антитела (например, IgG или IgM), исходным хозяином и типом метки, который является предпочтительным. В некоторых вариантах осуществления вторичное антитело представляет собой класс- или изотип-специфичное антитело (например, IgG, IgM, IgA, IgE или IgG). В некоторых вариантах осуществления вторичное антитело представляет собой специфичное к подклассу антитело (например, IgG1, IgG2, IgG2, IgG4, IgA1 или IgA2). В некоторых вариантах осуществления вторичное антитело связывается с одним или более классами или подклассами антител. В некоторых вариантах осуществления вторичное антитело связывается с тяжелой цепью первичного антитела. В некоторых вариантах осуществления вторичное антитело связывается с легкой цепью первичного антитела. В некоторых вариантах осуществления вторичное антитело связывается с легкой каппа-цепью первичного антитела. В некоторых вариантах осуществления вторичное антитело связывается с легкой лямбда-цепью первичного антитела. В некоторых вариантах осуществления вторичное антитело представляет собой антитело против Fc, или против F(ab), или против (Fab')<sub>2</sub>-фрагмента. В некоторых вариантах осуществления вторичное антитело представляет собой антитело кролика, мыши, козы, осла или курицы.

**[0264]** В отдельных вариантах осуществления мониторинг состояния, описанного в настоящем документе (например, MUC16-положительного рака), осуществляют путем

повторения способа диагностики в течение некоторого периода времени после первоначального диагноза.

**[0265]** Присутствие меченой молекулы может быть обнаружено в организме субъекта (т. е. *in vivo*) с использованием методов, известных в данной области техники для сканирования *in vivo*. Специалисты в данной области техники смогут определить подходящий метод для обнаружения конкретной метки. Способы и устройства, которые могут быть использованы в способах диагностики согласно настоящему изобретению, включают, не ограничиваясь перечисленным, компьютерную томографию (КТ), сканирование всего тела, такое как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), магнитно-резонансную томографию (МРТ) и ультразвуковое исследование.

**[0266]** Агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем документе, или композиция, содержащая, или клетки, экспрессирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть доставлены в организм субъекта различными способами. Они включают, не ограничиваясь перечисленным, парентеральный, интраназальный, интратрахеальный, пероральный, внутрикожный, местный, внутримышечный, внутрибрюшинный, трансдермальный, внутривенный, внутриопухолевый, конъюнктивальный и подкожный способы. Такие может быть использовано введение пульмональным способом, например, с использованием ингалятора или небулайзера и состава с аэрозольным агентом для применения в качестве спрея. В одном из вариантов осуществления агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент или композицию, описанные в настоящем документе, вводят субъекту парентерально. В некоторых вариантах осуществления указанное парентеральное введение представляет собой внутривенное, внутримышечное или подкожное введение.

**[0267]** Количество агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента или композиции, которое будет эффективным при лечении и/или предупреждении состояния, будет зависеть от природы заболевания и может быть определено с помощью стандартных клинических методик.

**[0268]** Точная доза, используемая в композиции, также будет зависеть от способа введения и типа рака и должна быть определена в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого субъекта. Например, эффективные дозы также могут варьировать в зависимости от средств введения, целевого сайта, физиологического состояния пациента (включая возраст, массу тела и здоровье), того, является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарственных средств или является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозировки лечения постепенно подпирают оптимальным образом для оптимизации безопасности и эффективности.

**[0269]** В отдельных вариантах осуществления для определения оптимальных диапазонов дозировок используют анализ *in vitro*. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых зависимости доза-ответ, полученных с помощью систем тестирования *in vitro* или на животных моделях.

**[0270]** Для агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента дозировка может составлять приблизительно от 0,0001 до 100 мг/кг, и, как правило, составляет от 0,01 до 15 мг/кг массы тела пациента. Например, дозировки могут составлять 1 мг/кг массы тела, 10 мг/кг массы тела или находиться в диапазоне 1-10 мг/кг, или, другими словами, составлять 70 мг или 700 мг или находиться в диапазоне 70-700 мг, соответственно, для пациента массой 70 кг. Как правило, человеческие антитела имеют более длительный период полувыведения из организма человека, чем антитела, происходящие от других видов, из-за иммунного ответа на чужеродные полипептиды. Таким образом, часто возможно введение более низких доз человеческих антител с меньшей частотой.

**[0271]** В отдельных вариантах осуществления, например, при введении сконструированных клеток, экспрессирующих антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, или CAR, субъекту вводят дозу в диапазоне от приблизительно одного миллиона до приблизительно 100 миллиардов клеток, например, от 1 миллиона до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 5 миллионов клеток, приблизительно 25 миллионов клеток, приблизительно 500 миллионов клеток, приблизительно 1 миллиард клеток, приблизительно 5 миллиардов клеток, приблизительно 20 миллиардов клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток,

приблизительно 40 миллиардов клеток или диапазон, определенный любыми двумя из вышеуказанных значений), например, от приблизительно 10 миллионов до приблизительно 100 миллиардов клеток (например, приблизительно 20 миллионов клеток, приблизительно 30 миллионов клеток, приблизительно 40 миллионов клеток, приблизительно 60 миллионов клеток, приблизительно 70 миллионов клеток, приблизительно 80 миллионов клеток, приблизительно 90 миллионов клеток, приблизительно 10 миллиардов клеток, приблизительно 25 миллиардов клеток, приблизительно 50 миллиардов клеток, приблизительно 75 миллиардов клеток, приблизительно 90 миллиардов клеток или диапазон, определенный любыми двумя из вышеуказанных значений), и в некоторых случаях от приблизительно 100 миллионов клеток до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 120 миллионов клеток, приблизительно 250 миллионов клеток, приблизительно 350 миллионов клеток, приблизительно 450 миллионов клеток, приблизительно 650 миллионов клеток, приблизительно 800 миллионов клеток, приблизительно 900 миллионов клеток, приблизительно 3 миллиарда клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 45 миллиардов клеток), или любое значение в пределах этих диапазонов. В некоторых вариантах осуществления доза всех клеток и/или доза отдельных субпопуляций клеток находится в диапазоне от или приблизительно от  $10^4$  до или приблизительно до  $10^9$  клеток/килограмм (кг) массы тела, например, от  $10^5$  до  $10^6$  клеток/кг массы тела, например,  $1 \times 10^5$  клеток/кг,  $1,5 \times 10^5$  клеток/кг,  $2 \times 10^5$  клеток/кг, или  $1 \times 10^6$  клеток/кг,  $2 \times 10^6$  клеток/кг,  $5 \times 10^6$  клеток/кг или  $10 \times 10^6$  клеток/кг массы тела, или приблизительно указанное значение. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки вводят в количестве или в пределах определенного диапазона погрешности от указанного количества, от или приблизительно от  $10^4$  до или приблизительно до  $10^9$  Т-клеток/килограмм (кг) массы тела, например, от  $10^5$  до  $10^7$  Т-клеток/кг массы тела.

**[0272]** Агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть введены многократно. Интервалы между однократными дозами могут составлять 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год или 2 года.

### **Комбинированные терапии**

**[0273]** В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе для лечения рака (например, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака молочной железы, рака фаллопиевой трубы, рака матки (например, эндометрия) или первичного рака брюшины) у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, дополнительно включают введение указанному субъекту одного или более дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент предназначен для лечения рака у субъекта (например, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака молочной железы, рака фаллопиевой трубы, рака матки (например, эндометрия) и первичного рака брюшины). В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент предназначен для лечения любых побочных действий лечения агентом антитела против MUC16 или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в настоящем документе.

**[0274]** В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой агент, используемый для лечения рака яичника. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой агент, используемый для лечения рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой агент, используемый для лечения рака легкого. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой агент, используемый для лечения рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой агент, используемый для лечения рака фаллопиевой трубы. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой агент, используемый для лечения рака матки (например, эндометрия). В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой агент, используемый для лечения первичного рака брюшины.

**[0275]** Агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, может быть введен одновременно или последовательно с дополнительным терапевтическим агентом (до и/или после него).

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и дополнительный терапевтический агент могут быть введены в одной и той же или разных композициях, и одним и тем же или разными способами введения. Первая терапия (которая представляет собой агент антитела против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, или дополнительный терапевтический агент) может быть введена до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель до), одновременно с или после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель после) введения второй терапии (агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе, или дополнительного терапевтического агента) субъекту с раком (например, раком яичника, раком поджелудочной железы, раком легкого, раком молочной железы, раком фаллопиевой трубы, раком матки (например, эндометрия) и первичным раком брюшины). В отдельных вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент, вводимый субъекту в комбинации с агентом антитела против MUC16 или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в настоящем документе, вводят в той же композиции (фармацевтической композиции). В других вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент, вводимый в комбинации с агентом антитела против MUC16 или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в настоящем документе, вводят субъекту в композиции, отличной от композиции агента антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе (например, используют две или более фармацевтических композиций).

#### **Иллюстративные популяции пациентов**

**[0276]** Субъектом, подлежащим лечению в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, может быть любое млекопитающее, такое как грызун, кошка, собака, лошадь, корова, свинья, обезьяна, примат или человек, и т. д. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой собаку. В контексте

настоящего документа термины «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо.

**[0277]** В отдельных вариантах осуществления у субъекта, подлежащего лечению в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, был диагностирован MUC16-положительный рак, включая, не ограничиваясь перечисленным, рак яичника, легкого, поджелудочной железы, молочной железы, матки, фаллопиевой трубы или первичный рак брюшины, или рак любой другой ткани, экспрессирующий MUC16.

### **Изделия и наборы**

**[0278]** В некоторых вариантах осуществления изобретения предложено изделие, содержащее вещества, пригодные для лечения рака, характеризующегося высокой экспрессией MUC16 и/или высоким аэробным гликолизом (например, рака почки, рака шейки матки или рака предстательной железы), или для доставки агента антитела против MUC16 (такого как полноразмерное антитело против MUC16) в клетку, экспрессирующую MUC16 на своей поверхности. Изделие может содержать контейнер и этикетку или листок-вкладыш в упаковку, расположенные на контейнере или связанные с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т. д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Как правило, контейнер содержит композицию, эффективную для лечения заболевания или расстройства, описанного в настоящем документе, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для раствора для внутривенного введения или флакон с пробкой, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой агент антитела против MUC16 согласно изобретению. На этикетке или листке-вкладыше в упаковку указано, что композицию используют для лечения конкретного состояния. Этикетка или листок-вкладыш в упаковку дополнительно содержит инструкции по введению пациенту композиции агента антитела против MUC16. Также рассматриваются изделия и наборы, содержащие комбинированную терапию, описанную в настоящем документе.

**[0279]** Листок-вкладыш в упаковку относится к инструкциям, обычно содержащимся в предназначенных для коммерческого применения упаковках

терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно применения таких терапевтических продуктов. В некоторых вариантах осуществления на листке-вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения рака (такого как ГЦК (гепатоцеллюлярная карцинома), меланома, плоскоклеточная карцинома легкого, карцинома яичника, опухоль желточного мешка, хориокарцинома, нейробластома, гепатобластома, опухоль Вильмса, несеминомная герминогенная опухоль яичка, карцинома желудка или липосаркома).

**[0280]** Кроме того, изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), натрий-фосфатный буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, он может дополнительно содержать другие вещества, являющиеся желаемыми с коммерческой точки зрения и точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

**[0281]** Также предложены наборы, пригодные для различных целей, например, для лечения рака, характеризующегося высокой экспрессией MUC16 и/или высоким аэробным гликолизом (например, рака почки, рака шейки матки или рака предстательной железы), или для доставки агента антитела против MUC16 (такого как полноразмерное антитело против MUC16) в клетку, экспрессирующую MUC16 на своей поверхности, необязательно в комбинации с изделиями. Наборы согласно изобретению включают один или более контейнеров, содержащих композицию агента антитела против MUC16 (или единичную лекарственную форму и/или изделие), и в некоторых вариантах осуществления дополнительно содержат другой агент (такой как агенты, описанные в настоящем документе) и/или инструкции по применению в соответствии с любым из способов, описанных в настоящем документе. Набор может дополнительно содержать описание выбора индивидуумов, подходящих для лечения. Инструкции, поставляемые в наборах согласно изобретению, как правило, представляют собой письменные инструкции на этикетке или листке-вкладыше в упаковку (например, листе бумаги, входящем в набор), но также приемлемы машиночитаемые инструкции (например, инструкции, хранящиеся на магнитном или оптическом диске).

**[0282]** Например, в некоторых вариантах осуществления набор содержит композицию, содержащую агент антитела против MUC16 (такой как полноразмерное антитело против MUC16). В некоторых вариантах осуществления набор содержит а) композицию, содержащую агент антитела против MUC16, и б) эффективное количество по меньшей мере одного другого агента, причем указанный другой агент усиливает эффект (например, эффект лечения, эффект обнаружения) указанного агента антитела против MUC16. В некоторых вариантах осуществления набор содержит а) композицию, содержащую агент антитела против MUC16, и б) инструкции по введению указанной композиции агента антитела против MUC16 индивидууму для лечения рака, характеризующегося высокой экспрессией MUC16 и/или высоким аэробным гликолизом (например, рака почки, рака шейки матки или рака предстательной железы). В некоторых вариантах осуществления набор содержит а) композицию, содержащую агент антитела против MUC16, б) эффективное количество по меньшей мере одного другого агента, причем указанный другой агент усиливает эффект (например, эффект лечения, эффект обнаружения) указанного агента антитела против MUC16, и с) инструкции по введению указанной композиции агента антитела против MUC16 и другого агента(ов) индивидууму для лечения рака, характеризующегося высокой экспрессией MUC16 и/или высоким аэробным гликолизом (например, рака почки, рака шейки матки или рака предстательной железы). Агент антитела против MUC16 и другой агент(ы) могут присутствовать в отдельных контейнерах или в одном контейнере. Например, набор может содержать одну отдельную композицию или две или более композиций, причем одна композиция содержит агент антитела против MUC16, а другая композиция содержит другой агент.

**[0283]** В некоторых вариантах осуществления набор содержит нуклеиновую кислоту (или набор нуклеиновых кислот), кодирующую агент антитела против MUC16 (такой как полноразмерное антитело против MUC16). В некоторых вариантах осуществления набор содержит а) нуклеиновую кислоту (или набор нуклеиновых кислот), кодирующую агент антитела против MUC16, и б) клетку-хозяина для экспрессии указанной нуклеиновой кислоты (или набора нуклеиновых кислот). В некоторых вариантах осуществления набор содержит а) нуклеиновую кислоту (или набор нуклеиновых кислот), кодирующую агент антитела против MUC16, и б)

инструкции по i) экспрессии указанного агента антитела против MUC16 в клетке-хозяине, ii) приготовлению композиции, содержащей указанный агент антитела против MUC16, и iii) введению указанной композиции, содержащей агент антитела против MUC16, индивидууму для лечения рака, характеризующегося высокой экспрессией MUC16 и/или высоким аэробным гликолизом (например, рака почки, рака шейки матки или рака предстательной железы). В некоторых вариантах осуществления набор содержит а) нуклеиновую кислоту (или набор нуклеиновых кислот), кодирующую агент антитела против MUC16, б) клетку-хозяина для экспрессии указанной нуклеиновой кислоты (или набора нуклеиновых кислот), и с) инструкции по i) экспрессии указанного агента антитела против MUC16 в указанной клетке-хозяине, ii) приготовлению композиции, содержащей указанный агент антитела против MUC16, и iii) введению указанной композиции, содержащей агент антитела против MUC16, индивидууму для лечения рака, характеризующегося высокой экспрессией MUC16 и/или высоким аэробным гликолизом (например, рака почки, рака шейки матки или рака предстательной железы).

**[0284]** Наборы согласно настоящему изобретению находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, не ограничиваясь перечисленным, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и т. п. Наборы могут необязательно содержать дополнительные компоненты, такие как буферы и информация для интерпретации. Таким образом, в настоящей заявке также предложены изделия, которые включают флаконы (такие как герметичные флаконы), бутылки, банки, гибкую упаковку и т. п.

**[0285]** Инструкции, относящиеся к применению композиций агента антитела против MUC16, как правило, включают информацию о дозировке, схеме дозирования и способе введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут представлять собой однократные дозы, упаковки нерасфасованного продукта (например, многодозовые упаковки) или субъединичные дозы. Например, могут быть предложены наборы, содержащие достаточные дозировки агента антитела против MUC16 (такого как полноразмерное антитело против MUC16), как раскрыто в настоящем документе, для обеспечения эффективного лечения индивидуума в течение длительного периода времени, такого как любой из недели, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13

дней, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 6 недель, 8 недель, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев или более. Наборы также могут включать несколько однократных доз агента антитела против MUC16 и фармацевтических композиций, и инструкции по применению, и упакованы в количествах, достаточных для хранения и применения в аптеках, например, в больничных аптеках и аптеках с рецептурно-производственным отделом.

**[0286]** Специалисту в данной области техники будет ясно, что в пределах объема и сущности настоящего изобретения возможны несколько вариантов осуществления. Далее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на следующие неограничивающие примеры. Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но, безусловно, не должны толковаться как ограничивающие его объем в какой-либо мере.

## ПРИМЕРЫ

**[0287]** Технология согласно настоящему изобретению дополнительно проиллюстрирована с помощью следующих примеров, которые никоим образом не должны толковаться как имеющие ограничительный характер. Следующие примеры демонстрируют получение, определение характеристик и применение иллюстративных антител против MUC16 согласно настоящей технологии. Следующие примеры демонстрируют получение человеческих и биспецифичных антител согласно настоящей технологии, а также определение специфичности их связывания и биологической активности *in vivo*.

### **Пример 1: Отбор и определение характеристик scFv, специфичных к человеческому MUC16**

**[0288]** Этот пример демонстрирует отбор и определение характеристик человеческих scFv, специфичных к человеческому MUC16 (hMUC16), из коллекции библиотек фагового дисплея человеческих scFv-антител. В частности, этот пример демонстрирует отбор человеческих scFv, которые специфически связываются с эктодоменом hMUC16 (MUC16-C114) в его нативном формате (т. е. MUC16, связанным с клеточной поверхностью). Пример также демонстрирует дальнейший отбор человеческих scFv, нацеленных на ключевой сайт N-гликозилирования (N30 в

c114 или N1806 в полноразмерном зрелом белке MUC16) на эктодомене MUC16 для ингибирования зависимых от гликозилирования эффектов MUC16 на метастазирование и инвазию. Структурное представление нативного MUC16 и усеченного MUC16-C114 вместе с его аминокислотной последовательностью приведено на фиг. 1. ScFv отбирали на основе высокой селективности к человеческому MUC16 посредством пэннинга против связанного с клеточной поверхностью MUC16-C114. Эти scFv против человеческого MUC16 представляют собой ценный источник компонентов антител для конструирования агентов антител против MUC16 в различных форматах, например, полноразмерного IgG, биспецифичных антител против MUC16, мультиспецифичных антител против MUC16 и т. п.

**[0289]** Две стабильные клеточные линии НЕК293, экспрессирующие белки MUC16, были созданы для мембранно-связанной экспрессии MUC16 для применения при отборе и определении характеристик scFv, специфически нацеленных на N-гликозилирование N30 на эктодомене MUC16. Была получена одна клеточная линия для экспрессии слитого белка MUC16-C114-GFP дикого типа (НЕК293-MUC16WT) и одна клеточная линия для экспрессии слитого белка N30-мутантного MUC16-C114-GFP (НЕК293-MUC16mut). Выравнивание эктодоменов MUC16-C114 дикого типа и N30-мутантного MUC16-C114 показано на фиг. 2. Как показано на фиг. 2, N30-мутантный MUC16-C114 имеет замену N30A. Экспрессию MUC16 клетками НЕК293-MUC16WT и НЕК293-MUC16mut подтверждали путем измерения экспрессии GFP с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Родительская клеточная линия НЕК293 не демонстрировала сигнала GFP. Напротив, клеточные линии НЕК293-MUC16WT и НЕК293-MUC16mut демонстрировали экспрессию GFP, хотя клеточная линия НЕК293-MUC16WT имела более сильный сигнал GFP, чем НЕК293-MUC16mut (фиг. 3). Клетки НЕК293-MUC16WT продемонстрировали увеличение сигнала GFP на 170-кратную величину средней интенсивности флуоресценции (MFI), в то время как клетки MUC16mut продемонстрировали 26-кратное увеличение MFI.

**[0290]** Коллекцию библиотек фагового дисплея человеческих scFv-антител (разнообразие свыше  $10 \times 10^{10}$ ), сконструированных Eureka Therapeutics (под товарным

знаком фаговых библиотек E-ALPHA<sup>®</sup>), использовали для отбора человеческих scFv, специфичных к hMUC16.

**[0291]** Фаговые библиотеки scFv E-ALPHA<sup>®</sup> подвергали скринингу (пэннингу) против hMUC16 путем совместной инкубации с родительскими клетками HEK293 отрицательного контроля и клетками HEK293, экспрессирующими слитый белок MUC16-C114-GFP (HEK293-MUC16WT). После тщательной промывки PBS клетки HEK293-MUC16WT со связанным фагом scFv-антитела центрифугировали. Связанные клоны затем элюировали и использовали для 2-3 дополнительных раундов пэннинга для обогащения фаговыми клонами scFv, которые специфически связывали MUC16. Связанные клоны затем элюировали и использовали для инфицирования клеток *E. coli* XL1-Blue. Затем очищали фаговые клоны, экспрессированные в бактериях.

**[0292]** 540 фаговых клонов, идентифицированных в результате пэннинга клеток, затем тестировали с помощью FACS-анализа на связывание с клетками HEK293-MUC16WT. Вкратце, 0,2 миллиона клеток (в PBS + 5% FBS + 0,05% NaN<sub>3</sub>) инкубировали в течение 2 часов при 4 °C с 50 мкл ~ 1,0 x 10<sup>11</sup> КОЕ/мл фага в PBS. FACS проводили с использованием первичного мышинового антитела к mAb M13 (Thermo, №MA1-12900) и вторичного антитела с PE к мышинному IgG (Vectors Lab, №EI-2007). Было идентифицировано 53 уникальных клонов, и 40 клонов продемонстрировали специфичное связывание с клетками HEK293-MUC16 WT.

**[0293]** 40 MUC16-специфичных клонов тестировали на их связывание с HEK293-MUC16WT, HEK293-MUC16mut и родительскими клетками HEK293. На фиг. 4 показаны результаты FACS-анализа с фагом отрицательного контроля и контролем без фага для всех трех клеточных линий. FACS-анализ с каждым из 40 клонов показал, что все 40 клонов демонстрировали связывание с HEK293-MUC16WT, в то время как 16 из 40 клонов демонстрировали минимальное связывание с HEK293-MUC16mut. Таким образом, эти клоны были специфичными к сайту N-гликозилирования (N30). На фиг. 5 показаны результаты для двух иллюстративных клонов, клона 8 и клона 12.

**[0294]** Затем 9 лучших клонов из 16 были протестированы на связывание с линиями MUC16<sup>+</sup> раковых клеток OVCA3, SKOV8 и OVCA432. Клоны 8 и 12 против MUC16 наиболее специфично связывались с линиями MUC16<sup>+</sup> раковых клеток, но не с линией MUC16<sup>-</sup> раковых клеток SKOV3 (фиг. 8). Несколько других клонов также

специфично связывались с линиями MUC16+ раковых клеток, хотя и с более низкими специфичностями (фиг. 7).

### **Пример 2: Создание биспецифичных антител против MUC16**

**[0295]** В этом примере описано создание биспецифичных антител (BsAb) против MUC16 из scFv против MUC16, идентифицированных в примере 1. В этом примере было получено одноцепочечное BsAb, содержащее scFv против MUC16 на N-конце и scFv против человеческого CD3ε из мышинового моноклонального антитела на C-конце. Клон 8 BsAb против MUC16 и клон 12 BsAb против MUC16 были получены путем клонирования фрагментов ДНК, кодирующих scFv против MUC16 и scFv-антитела против человеческого CD3ε, полученных из родительского клона L2K, в вектор экспрессии с использованием стандартной технологии ДНК. Гексагистидиновую (His) метку (SEQ ID NO: 33) вставляли после BsAb против MUC16 на C-конце для очистки и обнаружения антител.

**[0296]** Клетки яичника китайского хомячка (CHO) трансфицировали вектором экспрессии BsAb против MUC16 и достигали стабильной экспрессии путем стандартного отбора лекарственным средством с помощью метионина сульфоксимида (MSX), метода на основе глутаминсинтетазы (GS) (Fan, *et al.*, *Biotechnology Bioengineering*. 109 (4), 1007-1005 (2012)). Собирали супернатанты клеток CHO, содержащие секретированные молекулы BsAb против MUC16. BsAb против MUC16 очищали с использованием колонки HisTrap HP (GE healthcare) с помощью системы FPLC АКТА. Вкратце, культуру клеток CHO освещали и загружали на колонку с низкой концентрацией имидазола (20 мМ), а затем использовали изократический элюирующий буфер с высокой концентрацией имидазола (500 мМ) для элюирования связанного белка биспецифичного антитела против MUC16. Основные полосы для клона 8 BsAb и клона 12 BsAb наблюдались около 50 кДа с помощью SDS-PAGE, что указывает на то, что BsAb были успешно очищены.

### **Пример 3: BsAb против MUC16 – специфичность к MUC16+ клеткам**

**[0297]** В этом примере оценивали специфичность BsAb против MUC16 в отношении связывания с раковыми клетками, экспрессирующими MUC16. В одном

исследовании использовали две клеточные линии-мишени, клеточную линию MUC16<sup>+</sup> OVCAR3 и клеточную линию MUC16<sup>-</sup> SKOV3. Клеточные линии OVCAR3 и SKOV3 получали с помощью Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Виргиния) и поддерживали в культуре в соответствии с литературой ATCC. Проводили FACS-анализ связывания антитела против MUC16 с двумя клеточными линиями-мишенями для подтверждения того, что связывание антитела наблюдалось только с клеточной линией MUC16<sup>+</sup> OVCAR3. Клеточные линии SKOV3 или OVCAR3 инкубировали с антителом против MUC16 с последующим вторичным антителом или со вторичным антителом по отдельности в качестве контроля. Данные для клона 8 BsAb против MUC16 показаны на фиг. 6. Клеточная линия MUC16<sup>+</sup> OVCAR3 продемонстрировала увеличение связывания приблизительно на 300-кратную величину MFI по сравнению с контрольными клетками, в то время как SKOV3 демонстрировали только минимальный сигнал.

#### **Пример 4: BsAb против MUC16 – направленная клеточная цитотоксичность**

**[0298]** В этом примере оценивали способность BsAb против MUC16 индуцировать MUC16-специфичную клеточную токсичность. Клон 8 BsAb против MUC16 и клон 12 BsAb против MUC16 инкубировали в концентрации 0,2 мкг/мл либо с клеточной линией-мишенью MUC16<sup>+</sup> OVCAR3, либо с клеточной линией-мишенью MUC16<sup>-</sup> SKOV3 и активированными человеческими Т-клетками в соотношении эффе́ктор:мишень (Е:Т), составлявшем 5:1, в течение 16 часов. Цитотоксичность измеряли с помощью анализа высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Как показано на фиг. 7, клон 8 и клон 12 BsAb были способны индуцировать клеточный лизис клеток OVCAR3 на уровне приблизительно 90% и 65%, соответственно, в то время как клеточный лизис SKOV3 был минимальным, что указывает на то, что для активации Т-клеток необходима специфичность к MUC16<sup>+</sup> мишени. Таким образом, как клон 8 BsAb, так и клон 12 BsAb индуцировали мощное и специфичное уничтожение линии MUC16<sup>+</sup> раковых клеток.

**[0299]** В отдельном исследовании использовали четыре клеточные линии-мишени: клеточную линию MUC16<sup>+</sup> OVCAR3, клеточную линию MUC16<sup>-</sup> SKOV3, клеточную линию MUC16<sup>+</sup> SKOV8 и клеточную линию MUC16<sup>+</sup> OVCA432. Клон 8 BsAb против MUC16 и клон 12 BsAb против MUC16 инкубировали в концентрации 0,2 мкг/мл с

клеточной линией-мишенью и активированными человеческими Т-клетками в соотношении эффектор:мишень (Е:Т), составлявшем 3:1, в течение 16 часов.

Цитотоксичность измеряли с помощью анализа высвобождения ЛДГ. Более низкие проценты клеточного лизиса для MUC16<sup>+</sup> клеточных линий наблюдались при более низком соотношении Е:Т, составлявшем 3:1 (фиг. 8), по сравнению с соотношением Е:Т, составлявшим 5:1. Клеточный лизис MUC16<sup>-</sup> SKOV3 также был минимальным в этом исследовании, что дополнительно подтверждает, что для активации Т-клеток необходима специфичность к MUC16<sup>+</sup> мишени BsAb.

### **Пример 5: Терапия MUC16<sup>+</sup> метастатического рака яичника человека у мышей NSG**

**[0300]** В этом примере оценивали терапевтическую эффективность *in vivo* BsAb против MUC16 в мышинной ксенотрансплантатной модели метастатического рака яичника. Самкам мышей NSG в возрасте 6-8 недель в день 0 (D0) внутрибрюшинно (в/б) инъецировали  $3 \times 10^6$  опухолевых клеток SKOV3-MUC-CD, модифицированных для экспрессии MUC16-C114 и GFP-LUC. Затем этих мышей внутривенно (в/в) лечили  $1 \times 10^7$  человеческих Т-клеток на 7 день (D7) и в/б 5 мкг клон 8 BsAb против MUC16. Дополнительные введения 5 мкг BsAb осуществляли внутрибрюшинно на D9, D11, D14, D16 и D18, в общей сложности проводили шесть введений BsAb. Визуализацию животных проводили на D14, D21, D28 и D42. Порядок введения инъекций SKOV3-MUC-CD и BsAb в ходе эксперимента показан на фиг. 9А.

**[0301]** У животных, получавших клон 8 BsAb против MUC16, наблюдалось замедленное прогрессирование заболевания по сравнению с не получавшими лечения мышами или мышами, получавшими только Т-клетки (фиг. 9В). На фиг. 9С показаны кривые выживаемости мышей, несущих опухоли. Лечение клоном 8 BsAb против MUC16 значительно продлевало выживаемость у мышей, несущих опухоли, по сравнению с терапией Т-клетками или отсутствием лечения. Мыши, несущие опухоли, получавшие Т-клетки и BsAb против MUC16, также демонстрировали значительно повышенные уровни системных IL-2 и IFN- $\gamma$  через 7 дней после лечения, что указывает на индукцию противоопухолевого иммунного ответа (фиг. 9D). Указанные результаты демонстрируют, что введение BsAb против MUC16 задерживает прогрессирование заболевания и улучшает выживаемость в ксеногенной модели MUC16<sup>+</sup> метастатического рака яичника.

**Пример 6: Создание полноразмерных человеческих антител IgG против MUC16**

**[0302]** Полноразмерные человеческие IgG1 отобранных фаговых клонов продуцируют, например, в клеточных линиях НЕК293 и CHO, как описано (Tomimatsu, K. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73(7):1465-1469, 2009). Вкратце, переменные области антител из фаговых клонов субклонировали в векторы экспрессии млекопитающих с соответствующими последовательностями константной области человеческой легкой лямбда-цепи (SEQ ID NO: 31) и константной области человеческого IgG1 (SEQ ID NO: 28) (см. таблицу 5). Молекулярная масса очищенных полноразмерных антител IgG1 может быть измерена как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях с помощью электрофореза. Для определения чистоты белка может быть проведен SDS-PAGE-электрофорез очищенных антител IgG1.

**Таблица 5.**

Фаговый клон	Переменная HC	Константная HC	Переменная LC	Константная LC
8	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 31
12	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 31

**Пример 7: Определение характеристик полноразмерных человеческих антител IgG против MUC16**

**[0303]** Антитела IgG против MUC16 тестировали на связывание с клетками, экспрессирующими MUC16, такими как клетки НЕК293-MUC16wt или MUC16<sup>+</sup> клеточные линии, такие как OVCAR3, клеточная линия SKOV8 или клеточная линия OVCA432, с помощью проточной цитометрии. Тестировали дозозависимость связывания. Вкратце, клетки, экспрессирующие MUC16, инкубировали с различными количествами антител IgG против человеческого MUC16, например, при 10, 3,3, 1,1, 0,37, 0,12, 0,041, 0,014 или 0 мкг/мл, на льду в течение 1 часа. Антитела IgG против MUC16 оценивали на их аффинность к клеткам, экспрессирующим MUC16, по EC50 кривой зависимости от дозы (зависимости MFI от концентрации антитела). Кроме того, определяли кажущуюся  $K_D$  на основании значения EC50. Аффинность связывания антител IgG против MUC16 может быть определена, например, с помощью ForteBio.

### Пример 8: Определение характеристик полноразмерных человеческих антител IgG против MUC16

**[0304]** Оценивали способность клона 8 против MUC16 и клона 12 против MUC16 ингибировать инвазию в Matrigel. Моноклональное антитело 4H11 против MUC16 использовали в качестве отрицательного контроля. Анализы инвазии в Matrigel проводили со стабильными клеточными линиями рака яичника SKOV3, экспрессирующими phrGFP или phr-GFP-MUC16-C114, путем инкубирования клеток в присутствии или в отсутствие 4H11, клона 8 или клона 12. Клон 8 и клон 12 ингибируют инвазию в Matrigel, индуцированную MUC16-C114. Напротив, моноклональное антитело 4H11 против MUC16 не ингибирует инвазию в Matrigel, индуцированную MUC16-C114. Эти данные демонстрируют, что, в отличие от моноклонального антитела 4H11, клон 8 и клон 12 блокируют инвазию в Matrigel.

**Таблица 6. Таблица последовательностей**

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	hMUC16 (Незрелый )	MLKPSGLPGSSSPTRSLMTGSRSTKATPEMDSGLTGATLSPKTSTGA IVVTEHTLPFTSPDKTLASPTSSVVGRTTQSLGVMSSALPESTSRGM THSEQRTSPSLSPQVNGTPSRNYPATSMVSGLSSPRTRTSSTEGNFT KEASTYTLTVETSGPVTEKYTVPTETSTTEGDSTETPWDTRYIPVK ITSPMKTFADSTASKENAPVSMTPAETTVDSHTPGRTNPSFGTLYS SFLDLSPKGTNRSRGETSLELILSTTGYPFSSPEPGSAGHSRISTSAPL SSASVLDNKISETSIFSGQSLTSPSPGVPEARASTMPNSAIPFSMTL SNAETSAERVSTISSLGTPSISTKQTAETILTFHFAAETMDIPSTHIA KTLASEWLGSPGTLGGTSTALTTTSPSTTLVSEETNTHHSTSGKET EGTLNTSMTPLETSAPGEESEMATLVPTLGFTTLDISKIRSPSQVSS HPTRELRTTGSTSGRQSSSTA AHGSSDILRATTSSTSKASSWTSESTA QQFSEPQHTQWVETSPSMKTERPPASTSVAAPITTSVPSVVSFGFTTL KTSSTKGIWLEETSADTLIGESTAGPTTHQFAVPTGISMTGGSSSTRG SQGTTHLLTRATASSETSADLTLATNGVPVSVSPAVSKTAAGSSPPG GTKPSYTMVSSVIPETSSLQSSAFREGTSLGLTPLNTRHPFSSPEPDS AGHTKISTSIPLSSASVLEDKVSATSTFHHKATSSITGTPEISTKT KPSSAVLSSMTLSNAATSPERVRNATSPLTHPSPSGEETAGSVLTL TSAETDSPNIHPTGTLTSESSESPSTLSLPSVSGVKTTFSSTPSTHLF TSGEETEETSNPSVSQPETS VSRVRTLASTSVPTPVFPTMDTWPTR SAQFSSSHLVSELRATSSTSVTNSTGSALPKISHLTGTATMSQTNRD TFNDSAAPQSTTWPETSPRFKTGLPSATTTVSTSATLSATVMVSKF TSPATSSMEATSIREPSTTILTTETTNGPGSMAVASTNIPIGKGYITEG RLDTSHLPIGTTASSETSMDFTMAKESVSMVSPSQSMDAAGSSTP

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		<p>GRTSQFVDTFSDDVYHLTSREITIPRDGTSSALTPQMTATHPPSPDP  GSARSTWLGILSSSPSSPTPKVTMSSTFSTQRVTTSMIMDTVETSRW  NMPNLPSTTSLTPSNIPTSGAIGKSTLVPLDTPSPATSLEASEGGLPTL  STYPESTNTPSIHLGAHASSESPSTIKLTMASVVKPGSYTPLTFPSIET  HIHVSTARMA YSSGSSPEMTAPGETNTGSTWDPTTYITTTDPKDTSS  AQVSTPHSVRTLRTTENHPKTESATPAAYSGSPKISSSPNL TSPATK  AWTITDTEHSTQLHYTKLAEKSSGFETQSAPGPVSVVIPTSPTIGSS  TLELTSDVPGEPLVLAPSEQTTITLPMATWLSTSLTEEMASTDLDISS  PSSPMSTFAIFPPMSTPSHELKSEADTSAIRNTDSTTLDQHLGIRSLG  RTGDLTTVPITPLTTTWTSVIEHSTQAQDLSATMSPHTVTSQSLKDKQ  TSIPASASPSHLTEVYPELGTQGRSSSEATTFWKPSTDLSREIETGP  TNIQSTPPMDNTTTGSSSSGVTLGIAHLPIGTSSPAETSTNMALERRS  STATVSMAGTMGLLVTSAPGRSISQSLGRVSSVLSESTTEGVTDDSSK  GSSPRLNTQGNALSSSLEPSYAEQSQMSTSIPLTSSPTTPDVEFIGGS  TFWTKEVTTVMTSDISKSSARTESSATLMSTALGSTENTGKEKLR  TASMDLPSPTPSMEVTPWISLTL SNAPNTDSDLDSHGVTSSAGTL  ATDRSLNTGVTRASRLENGSDTSSKSLSMGNSTHTSMTYTEKSEVS  SSIHPRPETSAPGAETTLLTSTPGNRAISLTLPFSSIPVEEVISTGITS  INSAPMTHSPITPPTIVWTSTGTIEQSTQPLHAVSSEK VSVQTQSTPY  VNSVAVSASPTHENSVSSGSSTSSPYSSASLESLDSTISRRNAITSWL  WDLTTSPLTTTWPSTSLSEALSSGHSGVSNPSSTTTEFPLFSAASTSA  AKQRNPETETHGPQNTAASTLNTDASSVTGLSETPVGASISSEVPLP  MAITSRSDVSGLTSESTANPSLGTASSAGTKL TRTISLPTSESLVSFR  MNKDPWTVSIPLGSHPTTNTETSIPVNSAGPPGLSTV ASDVIDTPSD  GAESIPTVSFSPSPDTEVTTISHFPEKTTHSFRTISSLTHELTSRVTPIP  GDWMSSAMSTKPTGASPSITLGERRTITSAAPTTSPIVLTASF TETST  VSLDNETTVKTS DILDARKTNELPSDSSSSSDLINTSIASSTMDVTKT  ASISPTSISGMTASSPSL FSSDRPQVPTSTTETNTATSPSVSSNTYSL  DGGSNVGGTPSTLPPFTITHPVETSSALLAWSRPVRFSTMVSTD TA  SGENPTSSNSVVTSPAPGTWTSVGSSTDL PAMGFLKTSPAGEAHS  LLASTIEPATAFTPHLSAAVVTGSSATSEASLLTTSESKAIHSSPQTPT  TPTSGANWETSATPESLLVVTETS DTTLTSKILVTDILFSTVSTPPS  KFPSTGTL SGASFPTLLPDTPAIPLTATEPTSSLAT SFDSTPLVTIASDS  LGTVPETTLMSETSNGDALVLKTVSNPDRSIPGITI QGVTESPLHPS  STSPSKIVAPRN TTYEGSITVALSTLPAGTTGSLVFSQSSENSETTAL  VDSSAGLERASVMPLTTGSQGMASSGGIRSGSTHSTGKTFSS LPLT  MNPGEVTAMSEITNRLTATQSTAPKGIPVKPTSAESGLLTPVSASS  SPSKAFASLT TAPPTWGIPQSTLTFEFSEVPSLDTKSASLPTPGQSLN  TIPDSDASTASSLSKSPEKNPRARMMTSTKAISASSFQSTGFTETPE  GSASPSMAGHEPRVPTSGTGDPRYASESMSYPDPSKASSAMTSTSL  ASKLTTLFSTGQAARSGSSSSPISLSTEKETSFLSPTASTSRKTSFLG  PSMARQPNILVHLQTSALTL SPTSTLNMSQEPELTSSQTIAEEEGT  TAETQTLTFTPSETPTSLLPVSSPTEPTARRKSSPETWASSISVPAKTS  LVETTDGTLVTTIKMSSQAAQGNSTWPAPAEETGSSPAGTSPGSPE</p>

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		MSTTLKIMSSKEPSISPEIRSTVRNSPWKTPETTVPMETTVEPVTLQS TALGSGSTSISHLPTGTTSPTKSPTENMLATERVSLSPSPPEAWTNLY SGTPGGTRQSLATMSSVSLESPTARSITGTGQQSSPELVSKTTGMEF SMWHGSTGGTTGDTHVSLSTSSNILEDPVTSPNSVSSLTDKSKHKT ETWVSTTAIPSTVLNNKIMAAEQQTSRSVDEAYSSTSSWSDQTS GS DITLGASPDVTNTLYITSTAQTSSLVSLPSGDQGITSLTNPSGGKTSS ASSVTSPSIGLETLRANVSAVKSDIAPTAGHLSQTSSPAEVSILDVTT APTPGISTTITTMGTNSISITTPNPEVGMSTMDSTPATERRTTSTEHP STWSSTAASDSWTVTDMTSNLKVARSPGTISTMHTTSFLASSTELD SMSTPHGRITVIGTSLVTPSSDASAVK TETSTSERTLSPSDTTASTPIS TFSRVQRMSISVPDILSTSWTPSSTEAEDVPVSMVSTDHASTKTDPN TPLSTFLFDSLSTLDWDTGRSLSSATATTSAPQGATTPQELTLETMIS PATSQLPFSIGHITSAVTPAAMARSSGVTFSRPDPTSKKAEQTSTQLP TTTSAHPGQVPRSAATTLDVIPHTAKTPDATFQRQGQTALTTEARA TSDSWNEKEKSTPSAPWITEMMNSVSEDTIKEVTSSSSVLR TLNTLD INLESGTTSSPSWKSSPYERIAPESTTDKEAIHPSTNTVETTGWVTS SEHASHSTIPAHSASSKLTSPVTTSTREQAIVSMSTTTWPESTRART EPNSFLTIELRDVSPYMDTSSTTQTSIISSPGSTAITKGPRT EITSSKRIS SSFLAQSMRSDSPSEAITRLSNFPAMTESGGMILAMQTSPPGATSL SAPTLDTSATASWTGTPLATTQRFTYSEKTTLFSKGPEDTSQPSPPS VEETSSSSSLVPIHATTSPSNILLTSQGHSPSSTPPVTSVFLSETSGLG KTTDMSRISLEPGTSLPPNLSSTAGEALSTYEASRDTKAIHHSADTA VTNMEATSSEYSPGHTKPSKATSPLVTSHIMGDITSSTSVFGSSET TEIETVSSVNQGLQERSTSQVASSATETSTVITHVSSGDATTHVTKT QATFSSGTSISSPHQFITSTNTFTDVSTNPSTSLIMTESSGVTITTQTGP TGAATQGPYLLDTSTMPYL TETPLAVTPDFMQSEKTTLISKGPKDV SWTSPPSVAETSYPSSLTPFLVTTIPPATSTLQGQHTSSPVSATSVLTS GLVKTTDMLNTSMEPVTNSPQNLNPSNEILATLAATTDIETIHPSI NKAVTNMGTASSAHVLHSTLPVSSEPSTATSPMVPASSMGDALASI SIPGSETTDIEGEPTSSLTAGRKENSTLQEMNSTTESNILSNVSVGAI TEATKMEVPSFDATFIPTPAQSTKFPDIFSVASSRLSNSPPMTISTHM TTTQTGSSGATSKIPLALDTSTLETSAGTPSVVTEGFAHSKITTAMN NDVKDVSQTNPPFQDEASSPSSQAPVLVTTLPSSVAFTPQWHSTSSP VSMSSVLTSSLVKTAGKVDTSLETVTSSPQSMSNTLDDISV TSAATT DIETTHPSINTVVTNVGTTGS AFESHSTVSAYPEPSKV TSPNVTTST MEDTTISR SIPKSSKTRTETETSSLTPKLRETSISQEITSSTETSTVP YKELTGATTEVSR TDVTSSSSSTSPGPDQSTVSLDISTETNRLSTSPI MTESAEITITTQTGPHGATSQDTFTMDPSNTTPQAGIHSAMTHGFSQ LDVTTLMSRIPQDVS WTSPPSVDKTSSPSSFLSSPAMTTPSLISSTLPE DKLSSPMTSLLTSGLVKITDILRTRLEPVTSSLPNFSSTSDKILATSKD SKDTKEIFPSINTEETNVKANNSGHESHSPALADSETPKATTQMVIT TTVGDPA PSTSMPVHGSSETTNIKREPTYFLTPRLRETSTSQESSFPT DTSFLLSKVPTGTITEVSSTGVNSSSKISTPDHDKSTVPPDFTFTGEIPR VFTSSIKTKSAEMTITTQASPPESASHSTLPLDTSTTLSQGGTHSTVT

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		<p>QGFYSEVTTLMGMGPGNVSWMTTPPVEETSSVSSLMSSPAMTSPS  PVSSTSPQSISSPLPVTALPTSVLVTTTDLVLTGTTSPESVTSSPPNLSSI  THERPATYKDTAHTEAAMHHSTNTAVTNVGTSGSGHKSQSSVLAD  SETSKATPLMSTTSTLGDTSVSTSTPNISQTNQIQTEPTASLSPRLRES  STSEKTSSTTETNTAFSYVPTGAITQASRTEISSRSTSISDLDRPTIAPD  ISTGMITRLFTSPIMTKSAEMTVTTQTTTPGATSQGILPWDSTTLFQ  GGTHSTVSQGFPHSEITTLRSRTPGDVSWMTTPPVEETSSGFLMSP  SMTSPSPVSSSTSPESIPSSPLPVTALLTSVLVTTTNVLGTTSPPEVTSS  PPNLSSPTQERLTTYKDTAHTEAMHASMHTNTAVANVGTSSISGHES  QSSVPADSHTSKATSPMGITFAMGDTSVSTSTPAFFETRIQTESTSSL  IPGLRDTRTSEEINTVTETSTVLSEVPTTTTTEVSRTEVITSSRTTISGP  DHSKMSPISTETITRLSTFPFVTGSTEMAITNQTGPIGTISQATLTL  TSSTASWEGTHSPVTQRFPHSEETTTMSRSTKGVSWQSPSVEETSS  PSSPVPLPAITSHSSLYSAVSGSSPTSALPVTSLTSGRRKTIDMLDT  HSELVTSSLPSASSFSGEILTSEASTNTETIHFSENTAETNMGTTNSM  HKLHSSVSIHSQPSGHTPPKVTGSMMEDAIVSTSTPGSPETKNVDRD  STSPLTPELKEDSTALVMNSTTESNTVFSSVSLDAATEVSRAEVTTY  DPTFMPASAQSTKSPDISPEASSSHSNPPLTISTHKTIATQTGPSGVT  SLGQLTLDSTIATSAGTPSARTQDFVDSETTSMNNDLNDVLKTS  PFAEEANSLSSQAPLLVTTSPSPVTSTLQEHSTSSLVSVTSVPTPTL  AKITDMDTNLEPVTRSPQNLRLNTLATSEATTDHTMHPSINTAVAN  VGTSSPNEFYFTVSPDSDPYKATSAVVITSTSGDSIVSTSMPRSSAM  KKIESETTFLIFRLRETSTSQKIGSSSDTSTVFDKAFTAATTEVSRTE  LTSSRSTSIQGTEKPTMSPDTSTRSVTMLSTFAGLTKSEERTIATQTG  PHRATSQGLTWDTTSITTSQAGTHSAMTHGFSQLDLSTLTSRVPEYI  SGTSPPSVEKTSSSSLLSLPAITSPSPVPTTLPESRPSSPVHLTSLPTS  GLVKTTDMLASVASLPPNLGSTSHKIPTTSEDIKDTEKMYPSTNIAV  TNVGTSTSEKESYSSVPAYSEPPKVTSPMVTSTFNIRDTIVSTSMPGSS  EITRIEMESTFSLAHGLKGTSTSQDPIVSTEKSAVLHKLTTGATETSR  TEVASSRRTSIPGPDHSTESPDISTEVIPSLPISLGITESSNMIIITRTGP  PLGSTSQGTFTLDTPTTSSRAGTHSMATQEFPHSEMTTVMNKDPEIL  SWTIPPSIEKTSFSSSLMPSPAMTSPVSSSTLPKTIHTTTPSPMTSLLTPS  LVMTTDLTGTSPPEPTTSSPPNLSSTSHEILTTDEDTTAIEAMHPSTST  AATNVETTSSGHGSQSSVLADSEKTKATAPMDTTSTMGHTTVSTS  MSVSSETTKIKRESTYSLTPGLRETSISQNASFSTDTISVLSEVPTGTT  AEVSRTEVTSSGRTSIPGPSQSTVLPEISTRMTRLFASPTMTESAEM  TIPTQTGPSGSTSQDTLTLDTSTTKSQAKTHSTLQRFPHSEMTTLM  SRGPGDMSWQSSPSLENPSSLPSSLPLATTSPPISSSTLPVTISSSPLP  VTSLLTSSPVTTTDMMLHTSPELVTSSPPKLSHTSDERLTTGKDTTNT  EAVHPSTNTAASNVEIPSSGHESSALADSETSKATSPMFITSTQED  TTVAISTPHFLETSRIQKESISSLPKLRETGSSVETSSAIE TSAVLSEV  SIGATTEISRTEVTSSRSTSISGSAESTMLPEISTTRKIIKFPTSPILAESS  EMTIKTQTSPPGSTSESTFTLDTSTTPSLVITHSTMTQRLPHSEITTLV  SRGAGDVPRPSSLPVEETSPPSSQLSLSAMISPPVSSSTLPASSHSSA</p>

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		SVTSLLTPGQVKTTEVLDASAEPETSSPPSLSSSTSVEILATSEVTTDT EKIHPFSNTAVTKVGTSSSGHESPSSVLPDSETTKATSAMGTISIMGD TSVSTLTPALSNTRKIQSEPASSLTTRLRETSTSEETSLATEANTVLS KVSTGATTEVSRTEAISFRTSMSGPEQSTMSQDISIGTIPRISASSVL TESAKMTITTQTGPSESTLESTLNLNTATTPSWVETHSIVIQGFPHPE MTTSMGRGPGGVSWPSPFVKETSPPSSPLSLPAVTSHPVSTTFLA HIPPSPLPVTSLLTSGPATTTDILGTSTEPGTSSSSSLSTTSHERLTTYK DTAHTAVHPSTNTGGTNVATTSSGYKSQSSVLADSSPMCTTSTM GDTSVLTSTPAFLETRRIQTELASSLTPGLRESSGSEGTSSGTKMSTV LSKVPTGATTEISKEDVTSIPGPAQSTISPDISTRVSWFSTSPVMTES AEITMNTHTSPLGATTQGTSTLDTSSSTSLTMTHSTISQGFSSHSQMS TLMRRGPEDVSWMSPPLEKTRPSFSLMSSPATTSPSPVSSTLPESIS SSPLPVTSLLTSGLAKTDMMLHKSSEPVTNSPANLSSTSVEILATSEV TTDTEKTHPSSNRTVTDVGTSSSGHESTSFVLADSQTSKVTSPMUIT STMEDTSVSTSTPGFFETSRIQTEPTSSLTLGLRKTSSSEGTSLATEM STVLSGVPTGATAEVSRTEVTSSRSTISGFAQLTVSPETSTETITRLP TSSIMTESAEMMIKTQDPPGSTPESTHTVDISTTPNWVETHSTVTQ RFHSEMSTLVSRSPGDMLWPSQSSVEETSSASSLLSLPATTSPSPVS STLVEDFPSASLPVTSLLNPGLVITDRMGISREPGTSSTSNLSSTSH RLTTLEDTVDTEDMQPSTHTAVTNVRTSISGHESQSSVLSDSETPKA TSPMGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIQIEPTSSLTSGLRETSSSERIS SATEGSTVLSEVPSGATTEVSRTEVISSRGTSMSPDQFTISPDISTEA ITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGATSEGLTLTDTSTTTFWSGTHST ASPGFSSHSEMSTLMSRTPGDVPWPSLPSVEEASSVSSSLSSPAMTST SFFSTLPESISSPHPVALLTLGPVKTTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTS AEILATSEVTKDREKIHPSNTPVNVGTVIYKHLSPSSVLADLVTT KPTSPMATTSTLGNTSVSTSTPAFPETMMTQPTSSLTSGLREISTSQE TSSATERSASLSGMPTGATTKVSRTEALSLGRTSTPGPAQSTISPEIS TETITRISTPLTTTGAEMTIPKTGHSGASSQGTFTLDTSSRASWPG THSAATHRSPHSGMTTPMSRGPEDVSWPSRPSVEKTSPSSSLVSLSA VTSPSPLYSTPSESSHSSPLRVTSFLTPVMMKTTDMLDTSLEPVTTSP PSMNITSDESLATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTISARQEFYSSY PGLPEPSKVTSPVVTSSTIKDIVSTTIPASSEITRIEMESTSTLTPTPRET STSQEIHSATKPSTVPYKALTSATIEDSMTQVMSSSRGSPDQSTMS QDISTEVITRLSTSPIKTESTEMTITTQTGSPGATSRGTLTLDSTTFM SGTHSTASQGFSSHSQMTALMSRTPGDVPWLSHPSVEEASSASFSLSS PVMTSSSPVSSTLPDSIHSLLPVTSLLTSGLVKTELLGTSSSEPETSS PPNLSSTSAEILAITVTTDTEKLEMTNVVTSGYTHESPSSVLADSVT TKATSSMGITYPTGDTNVLSTPAFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSI SEETSSATEKSTVLSSVPTGATTEVSRTEAISSRSTIPGPAQSTMSD TSMETITRISTPLTRKESTDMAITPKTGPGATSQGTFTLDSSTASW PGTHSATTQRFQSVVTTTPMSRGPEDVSWPSPLSVEKNSPSSLVSS SSVTSPSPLYSTPSGSSHSSPVVTSFLTSIMMKATDMLDASLEPETT SAPNMNITSDESLAASKATTETEAIHV FENTAASHVETTSATEELYS

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		SSPGFSEPTKVISPVVTSSSIRDNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPG LRETRTSQDITSSSTETSTVLYKMPSGATPEVSRTEVMPSSRTSIPGPA QSTMSLDISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITTQTGYSLATSQVTLPLG TSMTFLSGTHSTMSQGLSHSEMTNLM SRGPESLSWTSPRFVETTRS SSSLTSLPLTTSLSPVSSLLDSSPSSPLPVTSLILPGLVKTTEVLDTS EPKTSSSPNLSSTSVEIPATSEIMTDTEKIHPSNTAVAKVRTSSSVHE SHSSVLADSETTITIPSMGITS AVDDTTVFTSNPAFSETRRIPTPTFSL TPGFRETSTSEETTSITETSAVLYGVPTSATTEVSMTEIMSSNRIHIPD SDQSTMSPDIITEVITRLSSSSMMSESTQMTITTQKSSPGATAQSTLT LATTAPLARHSTVPPRFLHSEMTLMSRSPENPSWKSSLFVEKTS SSSLLSLPVTTSPSVSSTLPQSIPSSFSVTSLTPGMVKTDTSTEPG TSLSPNLSGTSVEILAASEVTTDTEKIHPSMAVTNVGTTSSGHELY SSVSIHSEPSKATYPVGTSSMAETSISTSM PANFETTGFEAEPSHL TSGFRKTNMSLDTSSVPTNTPSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSPD WPPASQYTEIPVDIITPFNASPITESGITSFPE SRFTMSVTESTHHL TDLLPSAETISTGTVMP SLSEAMTSFATTGVPRAISGSGSPFSRTESG PGDATLSTIAESLPSSTPVFSSSTFTTDSSTIPALHEITSSSATPYRV DTSLGTESSTTEGRLVMVSTLDTSSQPGRTSSSPILDTRMTESVELG TVTSAYQVPSLSTRLTRTDGIMEHITKIPNEAAHRGTIRPVKGPQTST SPASPKGLHTGGTKRMETTTTALKTTTTALKTTSRATLTTSVYPTL GTLTPLNASMQMASTIPTEMMITTPYVFPDVPETSSLATSLGAETS TALPRTTPSVFNRESETTASLVSRSGAERSPVIQTLDVSSSEPDTTAS WVIHPAETIPTVSKTTPNFFHSELDTVSSSTATSHGADVSSAIPTNISPS ELDALTPLVTISGTDSTTFPTLTKSPHETETRTTWLTHPAETSSTIPR TIPNFHHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTSQVTSSG TDRNMTIPTLTLSPGEPKTIASLVTHPEAQTSSAIPSTISP AVSRLVT SMVTSLAAKTSTNRALTN SPGEPATTVSLVTHPAQTSPTVPWTTSI FFHSKSDTTPSMTTSHGAESSAVPTPTVSTEVPGVVTPLVTSRAVI STTIPILTLSPGEPETTPSMATSHGEEASSAIPPTVSPGVPGVVTSLV TSSRAVTSTTIPILTFSLGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTVLPEVPG MVTSLVASSRAVTSTTLPTLTLSPGEPETTPSMATSHGAEASSTVPT VSPEVPGVVTSLVTSSSGVNSTSIPTLILSPGELETTPSMATSHGAEA SSAVPTPTVSPGVSGVVTPLVTSRAVTSTTIPILTLSSSEPETTPSMA TSHGVEASSAVLTVSPEVPGMVTSLVTSSRAVTSTTIPTLTISSDEPE TTTSLVTHSEAKMISAIPTLAVSPTVQGLVTSLVTSSSGSETSAFSNLT VASSQPETIDSWVAHPGTEASSVPTLTVSTGEPFTNISLVTHPAESS STLPRTTSRFHSSELDTMPSTVTSPEAESSAISTTISPGIPGVLTSLV SSGRDISATFPTVPESPHESEATASWVTHPAVTSTTVPRTPPNYSHSE PDTTPSIATSPGAEATSDFPTITVSPDVPDMVTSQVTSSGTDTSITPT LTLSSGEPETTTSFITYSEHTSSAIPTLVSPGASKMLTSLVISSGTD TTTTFPTLTETPYEPETTAIQLIHPAETNTMVPRTTPKFSHSKSDTTL VAITSPGPEASSAVSTTISPDMSDLVTSLVPSSTGTDSTTFPTLSETP YEPETTATWLTHPAETSTTVSGTIPNFSHRGSDTAPSMVTSPGVDR SGVPTTTPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPGEPETTASSAT

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		<p>           HPGTQTGFTVPIRTVPSSEPDPTMASWVTHPPQTSTPVSRTTSSFSHSS            PDATPVMATSPRTEASSAVLTTISPGAPEMVTSQITSSGAATSTTVPT            LTHSPGMPETTALLSTHPRTETSKTFFPASTVFPQVSETTASLTIRPGA            ETSTALPTQTTSSLFLLVTGTSRVDLSPASPVS AKTAPLSTHPGT            ETSTMIPTSTLSLGLLETTGLLATSSSAETSTSTLTLTVSPA VSGLSSA            SITTDKPQTVTSWNTETSPSVTSVGPPEFSRTVTGTTMTLIPSEMP            PKTSHGEGVSPPTILRRTMVEATNLATTGSSPTVAKTTTTFN TLAGS            LFTPLTPGMSTLASESVTSRTSYNHRSWISTTSSYNRRYWTPATST            PVTSTFSPGISTSSIPSSAATVPFMPVFTLNFTITNLQYEEDMRHPGS            RKFNATERELQGLLKPLFRNSSLEYLYSGCRLASLRPEKDSSATAV            DAICTHRPDPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYV            NGFTHRSSMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPSTTAGPLLM PFTLN            TITNLQYEEDMRRTGSRKFNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGC            RLTLRPEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGLNREQLYWELSKLTND            IEELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVSTTSTPGTSTVDLRTSGTPSSL            SPTIMAAGPLLV PFTLNFTITNLQYGEDMGHPGSRKFNTTERVLQ            LLGPIFKNTSVGPLYSGCRLTSLRSEKDGAATGVDAICIHHLDPKSP            GLNRERLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRTSVPTSS            TPGTSTVDLGTSGTPFSLPSPATAGPLLVLFTLNFTITNLKYEEDMH            RPGSRKFNTTERVLQTLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLRSEKDGA            ATGVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRN            SLYVNGFTHWIPVPTSSTPGTSTVDLGSSTPSLPSTTAGPLLV PFT            LNFTITNLKYEEDMHCPGSRKFNTTERVLQSLGPMFKNTSVGPLY            SGCRLTLRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQL            TNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNTSTPGTSTVDLGTSGTP            SSLPSPTSAGPLLV PFTLNFTITNLQYEEDMHHPGSRKFNTTERVLQ            GLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLRPEKNGAATGMDAICSHRLDP            KSPGLNREQLYWELSQLTHGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSVA            PTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTTAVPLLV PFTLNFTITNLQYGED            MRHPGSRKFNTTERVLQGLLGPLFKNSSVGPLYSGCRLISLRSEKD            GAATGVDAICTHHLNPQSPGLDREQLYWQLSQMTNGIKELGPYTL            DRNSLYVNGFTHRSSGLTTSTPWTSTVDLGTSGTPSPVPSPTTGPL            LVPFTLNFTITNLQYEENMGHPGSRKFNTESVLQGLLKPLFKSTSV            GPLYSGCRLTLRPEKDGVA TRVDAICTHRPDPKIPGLDRQQLYWE            LSQ LTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTQRSSVPTTSTPGTFTVQPETS            ETSSLPGPTATGPVLLPFTLNFTITNLQYEEDMRRPGRKFNTTER            VLQGLLMPLFKNTSVSSLYSGCRLTLRPEKDGAATRVD AVCTHRP            DPKSPGLDRERLYWKLSQLTHGITELGPYTLDRHSLYVNGFTHQSS            MTTTRTPDTSTMHLATSRTPASLSGPM TASP LLVLFTINFTITNLRYE            ENMHHPGSRKFNTTERVLQGLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLRPK            KDGAATKVDAICTYRPDPKSPGLDREQLYWELSQLTHSITELGPYT            LDRDSLYVNGFTQRSSVPTT SIPGTPTVDLGTSGTPVSKPGPSAASPL            LVLFTLNFTITNLRYEENMQHPGSRKFNTTERVLQGLLRSLFKSTSV            GPLYSGCRLTLRPEKDGTATGVDAICTHHPDPKSPRLDREQLYWE         </p>

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		LSQLTHNITELGPYALDNDSLFVNGFTHRSSVSTTSTPGTPTVYLGA SKTPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMWPGSRKFNTTERV LQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGEATGVDAICTHRPD PTGPGLDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDRDSL YVNGFTHRSSVP TTSTGVVSEEPFTLNFTINNLR YMADMGQPGSLKFNITDNVMQHLL SPLFQRSSLGARYTGCRVIALRSVKNGAETRVDLLCTYLQPLSGPG LPIKQVFHELSSQQTHGITRLGPYSLDKDSL YLNGYNEPGPDEPPTTP KPATTFPLPSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNLQYSPDMGKGSATF NSTEGVLQHLLRPLFQKSSMGPFFYLG CQLISLRPEKDGAATGVDTT CTYHPDPVGPGLDIQQLYWELSQLTHGVTQLGFYVLD RDSL FINGY APQNLSIRGEYQINFHIVNWNLSNPDP TSS EYITLLRDIQDKVTTL YK GSQLHDTFRFCLVTNLTMDSVLVTVKALFSSNLDP SLVEQVFLDKT LNASFH WL GSTYQLVDIHVTEMESSVYQPTSSSSTQH FYLNFTITNL PYSQDKAQPGTTNYQRNKR NIEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTF RSVPNRHHTGVDSL CNFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNF TLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDL PFWAVILIGLAGLLGVITCLI CGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQCPGYYQSHLDLEDLQ
2	VH клона 8	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGL EWIGEINHSGSTNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAV YYCARQSYITDSWGQGT LVTVSS
3	VL клона 8	DIQLTQSPSAVSASVGDRVTITCRASQDVSKWLAWYQQKPGKAPR LLISAASGLQSWVPSRFSGSGSGTEFTLSISSLQPEDFATYYCQQANS FPWTFGQGTKVEIKR
4	HC-CDR1 клона 8	GGSFSGYY
5	HC-CDR2 клона 8	INHSGST
6	HC-CDR3 клона 8	ARQSYITDS
7	LC-CDR1 клона 8	QDVSKW
8	LC-CDR2 клона 8	AAS
9	LC-CDR3 клона 8	QQANSFPWT
10	VH клона 12	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGL EWIGEINHSGSTNYNPSLKSRIIMSVDTSKRQFSLKLSRATAADTAV YYCARWSPFSYKQMYDYWGQGT LVTVSS
11	VL клона 12	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSRGSIASAYVQWYQQRPGSAPIT VIYEDYERPSEIPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYD DNDHVIFGGGTVTVLG
12	HC-CDR1 клона 12	GGSFSGYY

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
13	HC-CDR2 клона 12	INHSGST
14	HC-CDR3 клона 12	ARWSPFSYKQMYDY
15	LC-CDR1 клона 12	RGSIASAY
16	LC-CDR2 клона 12	EDY
17	LC-CDR3 клона 12	QSYDDNDHVI
18	Сигнальн ый пептид	METDTLLLWVLLLWVPGSTG
19	scFv клона 8	DIQLTQSPSAVSASVGDRVTITCRASQDVSKWLAWYQQKPGKAPR LLISAASGLQSWVPSRFSGSGSGTEFTLSISSLQPEDFATYYCQQANS FPWTFGQGTKVEIKRSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAQVQLQQWG AGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHS GSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARQSYI TDSWGQGTLLVTVSS
20	scFv клона 12	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSRGSIASAYVQWYQQRPGSAPIT VIYEDYERPSEIPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYD DNDHVIFFGGGTVTLGSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAQVQLQQ WGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIN HSGSTNYPNPSLKSRIIMSVDTSKRQFSLKLSRATAADTAVYYCARW SPFSYKQMYDYWGQGTLLVTVSS
21	scFv против CD3	DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQG LEWIGYINPSRGYTNYSVKGRTITTDKSTSTAYMELSSLRSED TATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTITVTVSSGEGTSTGSGGSGGSGG ADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAP KRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQ WSSNPLTFGGGTVTKVEIK
22	Клон 8/биспеци фическое антитело против CD3	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQLTQSPSAVSASVGDRVTITCRAS QDVSKWLAWYQQKPGKAPRLLISAASGLQSWVPSRFSGSGSGTEF TSSISSLQPEDFATYYCQQANSFPWTFGQGTKVEIKRSRGGGGSGG GGSGGGGSLEMAQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGY YWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARQSYITDSWGQGTLLVTVSSSTSGGGGSDV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLE WIGYINPSRGYTNYSVKGRTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDAT YYCARYYDDHYCLDYWGQGTITVTVSSGEGTSTGSGGSGGSGGAD DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKR WIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWS SNPLTFGGGTVTKVEIKHHHHHH
23	Клон	METDTLLLWVLLLWVPGSTGNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSR

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
	12/биспецифическое антитело против CD3	GSIASAYVQWYQQRPGSAPITVIYEDYERPSEIPDRFSGSIDSSNSA SLTISGLKTEDEADYYCQSYDDNDHVIFGGGTVTVLGSRRGGGS GGGSGGGGSLEMAQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAVYGGSF GYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRIIMSVDTSKR QFSLKLRSAATAADTAVYYCARWSPFSYKQMYDYWGQGLVTVSS TSGGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGYTFTRYTMHWV RQAPGGGLEWIGYINPSRGYTNVADSVKGRFTITTDKSTSTAYMEL SSLRSEDATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTSTGSG GSGGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQ QKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGGTDYSLTINSLEAEDA ATYYCQQWSSNPLTFGGGTVVEIKHHHHHH
24	MUC16c344	WELSQLTHGVTQLGFYVLDLDRSLFINGYAPQNLIRGEYQINFHIVN QNLNPDPTSSEYITLLRDIQDKVTTLTKGSQLHDTFRFCLVTNLTM DSVLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFHQLGSTYQLVDIH VTEMESSVYQPTSSSSTQHFYLNFTITNLPYSQDKAQPQTNYQRN KRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSL CNFS PLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNE PLTGNSDLPFWAVILIGLAGLLGLITCLICGVLVTTRRRKKEGEYNV QQQCPGYQSHLDLEDLQ
25	MUC16c114	NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPN RNEPLTGNSDLPFWAVILIGLAGLLGLITCLICGVLVTTRRRKKEGE YNVQQQCPGYQSHLDLEDLQ
26	MUC16c86	NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMDLPFWAVILIGLAGLLGLITCLICGV LVTRRRKKEGEYNVQQQCPGYQSHLDLEDLQ
27	MUC16c80	NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPN RNEPLTGNSDLPFWAVILIGLAGLLGLITCLICGDLEDLQ
28	Константная область тяжелой цепи IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
29	Константная область тяжелой цепи IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNDRHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTL LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK
30	Константная область	QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGS PVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
	легкой цепи	GSTVEKTVAPTECS
31	MUC16c114 N30A	NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQAFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLPFWA VILIGLAGLLGLITCLICGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQCPGYYSHLDEDLQ
32	hMUC16 (зрелый)	DKTLASPTSSVVGRTTQSLGVMSSALPESTSRGMTHSEQRTSPSLSPQVNGTPSRNYPATSMV SGLSSPRTRTSSTEGNFTKEASTYTLTVETTSGPVTEKYTVPTETSTTEGDSTETPWDTRYIPVKITSPMKT FADSTASKENAPVSMTPAETT VTDSHTPGR TNPSFGTLYSSFLDLSPKGT PNRGETSLELILSTTGYPFSSPEPGSAGHSRISTSAPLSSSASVLDNKISETSIFSGQSLTSPLSPGVPEARASTMPNSAIPFSMTLSNAETSAERVRSTISSLGTPSISTKQTAETILTFHAF AETMDIPSTHIAKTLASEWLGSPGT LGGTSTSALT TTTSPSTTLVSEETNTHHSTSGKETEGTLNTSMTPLETSAPGEESEMTATLVPTLGFTTLDSKIRSPSQVSSSHPTRELRTTGSTSGRQSSSTA AHGSSDILRATTSSTSKASSWTSESTAQQFSEPQHTQWVE TSPSMKTERPPASTSVAAPITTSVPSVVS GF TTKTSSTKGIWLEETSADTLIGESTAGPTTHQFAVPTGISMTGGSSTRGSQGTTHLLTRATASSETSADLTLATNGVPVSVSPA VSKTAAGSSPPGGTKPSYTMVSSVIPETSSLQSSAFREGTSLGLTPLNTRHPFSSPEPDSAGHTKISTSIPLSSASVLEDKVSATSTFSHKA TSSITTGTPEISTKTKPSSAVLSSMTLSNAATSPERVRNATSPLTHPSPSGEETAGSVLTLSTSAETT DSPNIHPTGTLTSESSESPSTLSLPSVSGVKTTFSSTPSTHLFTSGEETEETS NPSVVSQPETS VSRVRTLASTSVPTPVFPTMDTWPTRSAQFSSSHLVSELRA TSSTSVTNSTGSALPKISHLTGTATMSQTNRDTFNDSAAPQSTTWPE TSPRFK TGLPSATTTVSTSATSLSATVMVSKFTSPATSSMEATSIREPSTTILTTETTNGPGSMAVASTNIPIGKGYITEGR LDTSHLPIGTTASSE TSMDFTMAKESVMSVSPSQSMDAAGSSTPGRTSQFVDTFSDDVYHLTSREITIPRDGTSSALTPQMTATHPPSPDPGSARSTWLGILSSSPSSPTPKVTMSSTFSTQRVT TSMIMDTVETSRWNMPNLPSTTSLTPSNIP TSGAIGKSTLVPLDTPSPATSLEASEGGLPTLSTYPESTNTPSIHLGAHASSESPSTIKLTMASVVKPGSYTPLTFPSIETHIHVSTARMAYSSGSPEMTAPGETNTGSTWDPTTYITTTDPKDTSSAQVSTPHSVRTLRTTENHPKTESATPAAYS GSPKISSPNLTSPATKAWTITDTTEHSTQLHYTKLAEKSSGFETQSAPGPVSVVIPTSP TIGSSTLELTS DVPGEPLVLAPSEQTTITLPMATWLSTSLTEEMASTDL DISSPSSPMSTFAIFPPMSTPSHELKSEADTSAIRNTDSTTLDQHLGIRSLGR TGD LTTVPITPLTTWTSVIEHSTQAQDTLSATMSPTHVTQSLKDQTSIPASASPSHLTEVYPELGTQGRSSSEATTFWKPSTDTLSREIETGPTNIQSTPPMDNTTTGSSSSGVT LGIAHLPIGTSSPAETSTNMALERRSSTATVSMAGTMGLLVTSAPGRSISQSLGRVSSVLSESTTEGVT DSSKGSSPRLNTQGNTALSSSLEPSYAEGSQMSTSIPLTSSPTTPDVEFIGGSTFWTKEVTTVMTSDISKSSARTESSATLMSTALGSTENTGKEKLRTASMDLPSPTPSMEVTPWISLTL SNAPNTTDSLDSLHGVTSSAGTLATDRSLNTGVTRASRLENGSDTSSKSLSMGNSTHTSMTYTEKSEVSSSIHPRPETSAPG

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		<p> AETTLTSTPGNRAISLTLPFSSIPVEEVISTGITSGPDINSAPMTHSPITP  PTIVWTSTGTIEQSTQPLHAVSSEKVSVQTQSTPYVNSVAVSASPTH  ENSVSSGSSTSSPYSSASLESLDSTISRRAITSWLWDLTTSPLTTTW  PSTSLSEALSSGHSGVSNPSSTTTEFPLFSAASTSAAKQRNPETETHG  PQNTAASTLNTDASSVTGLSETPVGASISSEVPLPMAITSRSDVSGLT  SESTANPSLGTASSAGTKLTRTISLPTSESLVFRMNKDPWTVSIPLG  SHPTTNTETSIPVNSAGPPGLSTVASDVIDTPSDGAESIPTVFSFSPD  TEVTTISHFPEKTTHSFRTISSLTHELTSRVTPIPGDWMSSAMSTKPT  GASPSITLGERRTITSAAPTTSPIVLTASFTESTVSLDNETTVKTSDI  LDARKTNELPSDSSSSDLINTSIASSTMDVTKTASISPTSISGMTASS  SPSLFSSDRPQVPTSTTETNTATSPSVSSNTYSLDGGSNVGGTPSTLP  PFTITHPVETSSALLAWSRPVRTFSTMVSTDTASGENPTSSNSVVT  VPAGTWT SVGSTTDL PAMGFLKTSPAGEAHSLLASTIEPATAFTPH  LSAAVVTGSSATSEASLLTSESKAIHSSPQPTTPTSGANWETSATP  ESLLVVTETSDTTLTSKILVTDILFSTVSTPPSKFPSTGTLSGASFPT  LLPDTPAIPLTATEPTSSLATSFDSTPLVTIASDSLGTVPETTLTMS  SNGDALVLKTVSNPDRSIPGITIQGVTESPLHPSSTSPSKIVAPRNTTY  EGSITVALSTLPAGTTGSLVFSQSENSETTALVDSSAGLERASVMP  LTTGSQGMASGGIRSGSTHSTGKTFSSLPLTMNPG EVTAMSEITT  NRLTATQSTAPKGI PVKPTSAESGLLTPVSASSSPSKAFASLTAPPT  WGIPQSTLTFEFSEVPSLDTKSASLPTPGQSLNTIPDSDASTASSLSK  SPEKNPRARMMTSTKAISASSFQSTGFTETPEGSASPSMAGHEPRVP  TSGTGDPRYASEMSYPDPSKASSAMTSTSLASKLTTLFSTGQAARS  GSSSSPISLSTEKETSFLSPTASTSRKTSLFLGPSMARQP NILVHLQTS  ALTLSPSTLNMSQEPELTSSQTIAEEEGTTAETQTLTFTPSETPTS  LLPVSSPTEPTARRKSSPETWASSISVPAKTSLVETTDGTLVTTIKMS  SQAAQGNSTWPAPAEETGSSPAGTSPGSPMSTTLKIMSSKEPSISPE  IRSTVRNSPWKTPETTVPMETTVEPVTLQSTALGSGSTSISHLPTGTT  SPTKSPTENMLATERVSLSPSPEAWTNLYSGTPGGTRQSLATMSS  VSLESPTARSITGTGQQSPELVSKTTGMEFSMWHGSTGGTTGDTH  VSLSTSSNILEDPVTSPNSVSSLTDKSKHKTETWVSTTAIPSTVLNNK  IMAAEQQTSRSVDEAYSSTSSWSDQTS GSDITLGASPDVTNTLYITS  TAQTSLVSLPSGDQGITSLTNPSGGKTSSASSVTSPSIGLET LRANV  SAVKSDIAPTAGHLSQTSSPAEVSILDVTTAPTPGISTTITTMGTNSIS  TTTTPNPEVGMSTMDSTPATERRTTSTEPSTWSSSTAASDSWTVTDM  TSNLKVARSPGTISTMHTTSFLASSTELDSMSTPHGRITVIGTSLVTP  SSDASAVKTETSTSERLTPSDTTASTPISTFSRVQRMSISVPDILSTS  WTPSSTEAEDEVVSMVSTDHASTKDPNTPLSTFLFDLSTLDWDT  GRSLSSATATTSAPQGATTPQELTLETMISPATSQLPFSIGHITSAVTP  AAMARSSGVTF SRPDPTS KKA EQTSTQLPTTSSAHPGQVPRSAATT  LDVIPHTAKTPDATAFQRQGQTALTTEARATSDSWNEKEKSTPSAPW  ITEMMNSVSEDTIKEVTSSSSVLR TLN TLNLDINLESGTTSSPSWKSSPY  ERAPSESTTDKEAIHPSTNTVETTGWVTSSEHASHSTIPAHSASSKL  TSPVVTTSTREQAIVSMSTTTWPESTRARTEPN SFLTIELRDVSPYM </p>

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		<p> DTSSTTQTSIISSPGSTAITKGPRTEITSSKRISSEFLAQSMRSDSPSE  AITRLSNFPAMTESGGMILAMQTSPPGATSLSAPTLDTSATASWTGT  PLATTQRFTYSEKTTLFSKGPEDTSQPSPPSVEETSSSSSLVPIHATTS  PSNILLTSQGHSPSTPPVTSVFLSETSGLGKTTDMSRISLEPGTSLPP  NLSSTAGEALSTYEAARDTKAIHHSADTAVTNMEATSSSEYSPIGHT  KPSKATSPLVTSHIMGDITSSTSVFGSSETTEIETVSSVNQGLQERSTS  QVASSATETSTVITHVSSGDATTHVTKTQATFSSGTSISSPHQFITST  NTFTDVSTNPSTSLIMTESSGVTITTQTGPTGAATQGPYLLDTSTMP  YLTEPLAVTPDFMQSEKTTLISKGPKDVSWTSPPSVAETSYPSSLT  PFLVTTIPPATSTLQGQHTSSPVSAATSVLTSGLVKTTDMLNTSMPEV  TNSPQNLNPSNEILATLAATTDIETIHPSINKAVTNMGTASSAHVL  HSTLPVSSEPSTATSPMVPASSMGDALASISIPGETTDIEGEPTSSLT  AGRKENSTLQEMNSTTESNIILSNVSVGAITEATKMEVPSFDATFIPT  PAQSTKFPDIFSVASSRLSNSPPMTISTHMTTTQTGSSGATSKIPLAL  DTSTLETSAAGTPSVVTEGFAHASKITTAMNNDVKDVSQTNPPFQDEA  SSPSSQAPVLVTTLPSSVAFTPQWHSTSSPVMSSVLTSGLVKTAGK  VDTLETVTSSPQSMSNTLDDISVTSAAATTDIETHPSINTVVTNVGT  TGSAFESHSTVSAYPEPSKVTSPNVTTSTMEDTTISRIPKSSKTTRT  ETETTSSLTPKLRETSISQEITSSSTETSTVPYKELTGATTEVSRDVT  SSSTSFPGPDQSTVSLDISTETNTRLSTSPIMTESAEITTTQTGPHGAT  SQDTFTMDPSNTPQAGIHSAMTHGFSQLDVTTLMSRIPQDVSWTS  PPVDKTSSPSSFLSSPAMTTPLISSTLPEDKLSPPMTSLLTSGLVKI  TDILRTRLEPVTSSLNFSSTSDKILATSKDSKDTKEIFPSINTEETNV  KANNNGHESHSPALADSETPKATTQMVIITTVGDPAPSTSMPVHGS  SETTNIKREPTYFLTPRLRETSTSQESSFPTDTSFLLSKVPTGTITEVSS  TGVNSSSKISTPDHDKSTVPPDFTGEPVFTSSIKTKSAEMTITTQA  SPPEASHTLPLDSTTTLQGGTHSTVTQGFYSEVTTLMGMGPGN  VSWMTTPPVEETSSVSSLMSSPAMTSPSPVSSSTSPQIPSSPLPVTAL  PTSVLVTTTDLVLTGTTSPESVTSSPPNLSSITHERPATYKDTAHTAA  MHSTNTAVTNVGTSGSGHKSQSSVLADSETSKATPLMSTTSTLGD  TSVSTSTPNISQTNQIQTEPTASLSPRLRESSTSEKTSSTTETNTAFSY  VPTGAIQASRTEISSRTSISDLDRPTIAPDISTGMITRLFTSPIMTKS  AEMTVTTQTTPGATSQGILPWDSTTLFQGGTHSTVSQGFPHSEIT  TLRSRTPGDVSWMTTPPVEETSSGFLMSPSMTSPSPVSSSTSPESIPSS  PLPVTALLTSVLVTTTNVLGTTSPPEVTSSPPNLSSPTQERLTTYKDT  AHTTEAMHASMHTNTAVANVGTSSISGHESQSSVPADSHTSKATSPM  GITFAMGDTSVSTSTPAFFETRIQTESTSSLIPGLRDTRTSEEINTVTE  TSTVLSEVPTTTTTEVSRTEVITSSRTTISGPDHSMSPYISTETITRLS  TFPFVTGSTEMAITNQTGPIGTISQATLTLDTSSASWEGTHSPVTQR  FPHSEETTTMSRSTKGVSWQSPPSVEETSSPSSPVPLPAITSHSSLYS  AVSGSSPTSALPVTSLTSGRRKTIDMLDTHSELVTSSLPSASSFSGEI  LTSEASTNTETIHFSSENTAETNMGTNSMHKLHSSVSIHSQPSGHTP  PKVTGSMMEDAIVSTSTPGSPETKNVDRDSTSPLELKEDSTALV  MNSTTESNTVFSSVSLDAATEVSRAEVTTYDPTFMPASAQSTKSPDI </p>

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		<p> SPEASSSHSNPPLTISTHKTIATQTGPSGVTSLGQLTLDTSTIATSAG  TPSARTQDFVDSETTSVMNNDLNDVLKTSFSAEEANSLSSQAPLL  VTTSPSPVTSTLQEHSTSSLVSVTSVPTPLAKITDMDTNLEPVTRSP  QNLRNLTATSEATTDHTMHPSENTAVANVGTTSSPNEFYFTVSPDS  DPYKATSAVVITSTSGDSIVSTSMRSSAMKKIESETTFLIFRLRETS  TSQKIGSSSDTSTVFDKAFTAATTEVSRTEL TSSSRTSIQGTEKPTMS  PDTSTRSVTMLSTFAGLTKSEERTIATQTGPHRATSQGLTLDWTSIT  TSQAGTHSAMTHGFSQLDLSTLTSRVPEYISGTSPPSVEKTSSSSSLL  SLPAITSPSPVPTLPESRPSSPVHLTSLPTSGLVKTDDMLASVASLPP  NLGSTSHKIPTTSEDIKDTEKMYPSTNIAVTNVGTTTSEKESYSSVPA  YSEPPKVTSPMVTSTFNIRDTIVSTSMPGSSEITRIEMESTFLAHGLK  GTSTSQDPIVSTEKSAVLHKLTTGATETSRTEVASSRRTSIPGPDHST  ESPDISTEVIPSLPISLGITESSNMTHITRTGPPLGSTSQGTFTLDTPTTS  SRAGTHSMATQEFPHSEMTTVMNKDPEILSWTIPPSIEKTSFSSSLM  PSPAMTSPPVSSTLPKTIHTTSPMSTLLTPSLVMTTDTLGTSPPTTS  SPPNLSSTSHIELTTDEDTTAEAMHPSTSTAATNVETTSSGHGSQSS  VLADSEKTKATAPMDTTSTMGHTTVSTSMSVSSETTKIKRESTYSL  TPGLRETSISQNASFSTDTSIVLSEVPTGTTAEVSRTEVTSSGRTSIPG  PSQSTVLPEISTRMTMLRFASPTMTESAEMTIPTQTGPSGSTSQDTLT  LDTSTTKSQAKTHSTLTQRFPHEMTTLMRGPGDMSWQSSPSLEN  PSSLPSLLSLPATTSPPISSSTLPVTISSSPLPVTSLLTSSPVTTTDMMLHT  SPELVTSSPPKLSHTSDERLTTGKDTTNTAEVHPSTNTAASNVEIPSS  GHESPSSALADSETSKATSPMFITSTQEDTTVAISTPHFLETSRIQKES  ISSLSPKLRETGSSVETSSAIE TSAVLSEV SIGATTEISRTEVTSSSRTSI  SGSAESTMLPEISTRKIIKFPTSPILAESSEMTIKTQTSPPGSTSESTFT  LDTSTTPSLVITHSTMTQRLPHSEITTLVSRGAGDVPRPSSLPVEETS  PPSSQLSLSAMISPPVSSTLPASSHSSASVTSLLTPGQVKTTVEVLD  ASAEPETSSPSSLSTSVAILATSEVTTDTEKIHFPSENTAVTKVGTSSS  GHESPSSVLPDSETTKATSAMGTISIMGDTSVSTLTPALSNTRKIQSE  PASSLTRLRETSTSEETSLATEANTVLSKVSTGATTEVSRTEAISFS  RTSMGPEQSTMSQDISIGTIPRISASSVLTESAKMTITTQTGPSESTL  ESTLNLNTATTPSWVETHSIVIQGFPHPEMTTSMGRGPGGVSWSPP  FVKETSPSSPLSLPAVTSHPVSTTFLAHIPPSPLPVTSLLTSGPATT  DILGTSTEPGTSSSSSLSTTSHERLTTYKDTAHTAEVHPSTNTGGTN  VATTSSGYKSQSSVLADSSPMCTTSTMGDTSVLTSTPAFLETRRIQT  ELASSLTPGLRESSGSEGTSSTGTMSTVLSKVPTGATTEISKEDVTSI  PGPAQSTISPDISRTVSWFSTSPVMTESAEITMNTHTSPLGATTQGT  STLDTSSSTSLTMTHSTISQGFSHSQMSTLMRRGPEDVSWMSPPLE  KTRPSFLMSSPATTSPSPVSSTLPESISSPLPVTSLLTSGLAKTTDM  LHKSSEPVTNSPANLSSTSVAILATSEVTTDTEKTHPSSNRTVTDVG  TSSSGHESTSFVLADSQTSKVTSPMVTSTMEDTSVSTSTPGFFETSR  IQTEPTSSLTLGLRKTSSSEGTSLATEMSTVLSGVPTGATAEVSRTEV  TSSSRTSISGFAQLTVSPETSTETITRLPTSSIMTESAEMMIKTQDPP  GSTPESTHTVDISTTPNWVETHSTVTQRFHSEM TTLVSRSPGDML </p>

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		<p>WPSQSSVEETSSASSLLSLPATTSPSPVSSTLVEDFPSASLPVTSLLNP  GLVITDRMGISREPGTSSTSNLSSTSHERLTTLEDTVDTEDMQPST  HTAVTNVRTSISGHESQSSVLSSETPKATSPMGTTYTMGETSVSIS  TSDFFETSRIQIEPTSSLTSGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVPSGATT  EVSRTVEISSRGTSMGPDQFTISPDISTEAITRLSTSPIMTESAESAITI  ETGSPGATSEGTLTLDSTTTFWSGTHSTASPGFSHSEM TTLMSRTP  GDVPWPSLPSVEEASSVSSSLSSPAMTSTSTFFSTLPESISSSPHPVTAL  LTLGPVKTTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATSEVTKDREKIHP  SSNTPVVNVGTVIYKHLSPSSVLADLVTTKPTSPMATTSTLGNTSVS  TSTPAFPETMMTQPTSSLTSGLREISTSQETSSATERSASLSGMPTGA  TTKVSRTREALSLGRSTPGPAQSTISPEISTETITRISTPLTTTGS AEMT  ITPKTGHS GASSQGTFTLDTSSRASWPGTHSAATHRSPHSGMTTPM  SRGPEDVSWPSRPSVEKTSPSSLVSLSAVTSPLSTPSESSHSSPL  RVTSLFTPVMKTTDMLDTSLEPVTSPPSMNITSDSLATSKATM  ETEAIQLSSENTAVTQMGTISARQEFYSSYPGLPEPSKVTSPVVTSSTI  KDIVSTTIPASSEITRIEMESTSTLTPTPRETSTSQEIHSATKPSTVPYK  ALTSATIEDSMTQVMSSSRGPPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTES  TEMTITTQTGSPGATSRGTLTLDSTTFMSGTHSTASQGFHSQMTA  LMSRTPGDVPWLSHPSVEEASSASFSLSSPVMTSSSPVSSTL PDSIHS  SSLPVTSLTSGLVKTTTELLGTSSEPETSSPPNLSSTSAEILAITEVTTD  TEKLEMTNVVTSGYTHESPSSVLADSVTTKATSSMGITYPTGDTNV  LTSTPAFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSSVPT  GATTEVSRTEAIISSRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRKEST  DMAITPKTGPSGATSQGTFTLDSSSTASWPGTHSATTQRFQSVVTT  PMSRGPEDVSWPSPLSVEKNPSSLVSSSVTSPSPLYSTPSGSSHSS  PVPVTSLFTSIMMKATDMLDASLEPETTSAPNMNITSDSLAASKAT  TETEAIHV FENTAASHVETTSATEELYSSSPGFSEPTKVISPVVTSSSI  RDNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPGLRETRTSQDITSS TETSTVL  YKMPSGATPEVSRTEVMPSRRTSIPGPAQSTMSLDISDEVVTRLSTS  PIMTESAEITITTQGYSLATSQVTLPLGTSM TFLSGTHSTMSQGLSH  SEMNLMSRGPESLSWTS PRFVETTRSSSSLTSLPLTTSLSPVSS TLL  DSSPSSLPVTS LILPGLVKTTTEVLDTSSSEPKTSSSPNLSSTSV EIPATS  EIMTDTEKIHPSNTAVAKVRTSSSVHESHSSVLADSETTITIPSMGIT  SAVDDTTVF TSNPAFSETRRIPTPTFLTPGFRETSTSEETTSITETSA  VLYGVPTSATTEVSMTEIMSSNRIHIPDSQSTMSPDIIITEVITRLSSS  SMMSESTQMTITTQKSSPGATAQSTLTLATTTAPLARTHSTVPPRFL  HSEM TTLMSRSPENPSWKSSLFVEKTSSSSSLLSLPVT TSPSVSS TLP  QSIPSSSFSVT SLLTPGMVKT TDTSTEPGTS LSPNLSGTSVEILAASEV  TTDTEKIHPSSSMAVTNVGTTSSGHEL YSSVSIHSEPSKATYPVGTPS  SMAETSISTSM PANFETTGF EAEPF SHLTSGFRKTNMSLD TSSVPTPT  NTPSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSPDWPPASQYTEIPVDIITPFNA  SPSITESTGITSFPESRFTMSVTESTHHLSTDLLPSAETISTGTVMPSLS  EAMTSFATTGV PRAISGSGSPFSRTESGPGDATLSTIAESLPSSTPVPF  SSSTFTTTDSSTIPALHEITSSSATPYRVD TSLGTESS TTEGRLVMVST</p>

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		<p>LDTSSQPGR TSSSPILDTRMTESVELGTVTSAYQVPSLSTR LTRTDGI  MEHITKIPNEAAHRGTIRPVKGPQTSTSPASPKGLHTGGTKRMETTT  TALKTTTTALKTTSRATLTTSVYTPTLGLTLPNMQMASTIPTM  MITTPYVFPDVPETTSSLATSLGAETSTALPRTPPSVFNRESETTASL  VSRSGAERSPVIQTLDVSSSEPDTTASWVIHPAETIPTVSKTTPNFFH  SELDTVSSTATSHGADVSSAIPTNISPSELDALPLVTISGTDSTTFP  TLTKSPHETETRTTWLTHPAETSS TIPRTIPNF SHHESDATPSIATSPG  AETSSAIPIMTVSPGAEDLVTSQVTSSGTDNRNMTIPTLTLSPGEPKTI  ASLVTHPEAQTSSAIPTSTISPAVSR LVTSMVTS LAAKTSTTNRALTN  SPGEPATTVSLVTHPAQTSPTVPWTT SIFFH SKSDTTPSM TTSHGAE  SSAVPTPTVSTEVPGVVTP LVTS SRAVISTTIPILTLSPGEPETTPSMA  TSHGEEASSAIPTPTVSPGVPGVV TSLVTSSRAVTSTTIPILTFSLGEP  ETTPSMATSHGTEAGSAVPTVLPEVPGMVTSLVASSRAVTSTTLPT  LTLSPGEPETTPSMATSHGAEASSTVPTVSPEVPGVV TSLVTSSSGV  NSTSIPTLILSPGELETTSPMATSHGAEASSAVPTPTVSPGVSGVVTP  LVTS SRAVTSTTIPILTLSSSEPETTPSMATSHGVEASSAVLTVSPEVP  GMVTSLVTSSRAVTSTTIPTLTISSDEPETTTSLVTHSEAKMISAIPTL  AVSPTVQGLV TSLVTSSGSETSAFNLTVASSQPETIDSWVAHPGTE  ASSVPTLTVSTGEPFTNISLVTHPAESSSTLPR TTSRFSHSELDTMPS  TVTSPEAESSSAISTTISPGIPGVL TSLVTSSGRDISATFPTVPESPHE  EATASWVTHPAVTSTTVPR TTPNYSHSEPDTTPSIATSPGAEATSDF  PTITVSPDVPDMVTSQVTSSGTDTSITIP TLTLSSGEPETTTSFITYSET  HTSSAIPTLPVSPGASKMLTSLVISSGTDSTTFPTLTETPYEPETTAI  QLIHPAETNTMVPRTTPKF SHSKSDTTL PVAITSPGPEASSAVSTTTIS  PDMSDLV TSLVPSSGTDSTTFPTLSETPYEPETTATWLTHPAETSTT  VSGTIPNF SHRGSDTAPSMVTSPGVDTRSGVPTTTIPPSIPGVVTSQV  TSSATDTSTAIPTLTPSPGEPETTASSATHPGTQTGFTVPIRTVPSSEP  DTMASWVTHPPQTSTPVSRTTSSFSHSSPDATPVMATSPRTEASSAV  LTTISPGAPEMVTSQITSSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALLSTHPR  TETSKTFPASTVFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTSSSLFTLLVT  GTSRVDLSPTASPGVSAKTAPLSTHPTGTETSTMIPTSTLSLGLLETTG  LLATSSSAETSTSTLTLTVSPA VSGLSSASITDKPQTVTSWNTETSP  SVTSVGPPEFSRTVTGTTMTLIPSEMPTPKTSHGEGVSPTTILRTTM  VEATNLATTGSSPTVAKTTTTFN TLAGSLFTPLTPGMSTLASESVT  SRTSYNHR SWISTTSSYNRRYWPATSTPVTSTFSPGISTSSIPSSTAA  TVPFMVPFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNATERELQGLLKPLF  RNSSLEYLYSGCRLASLRPEKDSSATAVDAICTHRPDPEDLGLDRER  LYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSMPTTSTPGTST  VDVGTSGTPSSSPSTTAGPLLMPFTLNFTITNLQYEEDMRRTGSRK  FNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLRPEKDGAATGVD  AICTHRLDPKSPGLNREQLYWELSKLTNDIEELGPYTLDRNSLYVN  GFTHQSSVSTTSTPGTSTVDLRTSGTPSSLSSPTIMAAGPLLVPFTLN  FTITNLQYGEDMGHPGSRKFNTTERVLQGLLGPIFKNTSVGPLYSG  CRLTSLRSEKDGAATGVDAICIHHLDPKSPGLNRERLYWELSQLTN</p>

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
		<p>GIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRTSVPTSSTPGTSTVDLGTSGTPFS  LSPATAGPLLVLFTLNFTITNLKYEEDMHRPGSRKFNTTERVLQTL  LGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSP  GVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSS  TPGTSTVDLGSSTPSSLPSPTTAGPLLVPFTLNFTITNLKYEEDMHCP  GSRKFNTTERVLQSLGPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAAT  GVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSL  YVNGFTHQTSAPNTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTSAGPLLVPFTL  NFTITNLQYEEDMHHPGSRKFNTTERVLQGLLGPMFKNTSVGLLYS  GCRLTLLRPEKNGAATGMDAICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQL  THGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGTP  SSLPSPTTAVPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPGSRKFNTTERVLQ  GLLGPLFKNSSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAICTHHLNPQS  PGLDREQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSGLT  TSTPWTSTVDLGTSGTPSPVPSPTTTPGPLLVPFTLNFTITNLQYEENM  GHPGSRKFNITESVLQGLLKPLFKSTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDG  VATRVAICTHRPDPKIPGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDS  LYVNGFTQRSSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPTATGPVLLPFT  LNFTITNLQYEEDMRRPGSRKFNTTERVLQGLLMPLFKNTSVSSLY  SGCRLTLLRPEKDGAATRVDVCTHRPDPKSPGLDRERLYWKLSQ  LTHGITELGPYTLDRHSLYVNGFTHQSSMTTTRTPDTSTMHLATSR  TPASLSGPMTASPLLVLFTINFTITNLRYEENMHHPGSRKFNTTERV  LQGLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPKKDGAATKVAICTYRPD  PKSPGLDREQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTQRSSVP  TTSIPGTPTVDLGTSGTPVSKPGPSAASPLLVLFTLNFTITNLRYEEN  MQHPGSRKFNTTERVLQGLLRSLFKSTSVGPLYSGCRLTLLRPEKD  GTATGVDAICTHHPDPKSPRLDREQLYWELSQLTHNITELGPYALD  NDSL FVNGFTHRSSVSTTSTPGTPTVYLGASKTPASIFGPSAASHLLI  LFTLNFTITNLRYEENMWPGSRKFNTTERVLQGLLRPLFKNTSVGP  LYSGCRLTLLRPEKDGEATGVDAICTHRPDPGGLDREQLYLELS  QLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFT  INNLRYMADMGPGLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGC  RVIALRSVKNGAETRVDLLCTYLQPLSGPGLPIKQVFHLSQQTHGI  TRLGPYSLDKDSL YLNGYNEPGPDEPPTTPKPATTFLLPPLSEATTAM  GYHLKTLTNFTISNLQYSPDMGKGSATFNSTEGVLQHLLRPLFQK  SSMGPFFYLGCQLISLRPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQL  YWELSQLTHGVTQLGFYVLDLDRDSL FINGYAPQNLSIRGEYQINFHIV  NWNLSNPDPPTSSEYITLLRDIQDKVTTLYKGSQ LHD TFRFCLVTNLT  MDSVLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFWLGGSTYQLVDI  HVTEMESSVYQPTSSSTQH FYLNFTITNLPYSQDKAQPGTTNYQR  NKRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSLCNF  SPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRN  EPLTGNSDL PFWAVILIGLAGLLGVITCLICGVLVTTTRRRKKEGEYN  VQQQCPGY YQSHLDLEDLQ</p>

**[0305]** Настоящее изобретение может быть описано посредством следующих неограничивающих вариантов осуществления:

**[0306]** Вариант осуществления 1: Конструкция, связывающая муцин-16 (MUC16), содержащая компонент антитела, иммуноспецифически распознающий полипептид муцина-16 (MUC16), где указанный компонент антитела содержит: а) (i) переменную тяжелую (VH) цепь, содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HC-CDR) 1, HC-CDR2 и HC-CDR3 переменного домена тяжелой цепи с SEQ ID NO: 2; и (ii) переменную легкую (VL) цепь, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (LC-CDR) 1, LC-CDR2 и LC-CDR3 переменного домена легкой цепи с SEQ ID NO: 3; или (b) (i) переменную тяжелую (VH) цепь, содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HC-CDR) 1, HC-CDR2 и HC-CDR3 переменного домена тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10; и (ii) переменную легкую (VL) цепь, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (LC-CDR) 1, LC-CDR2 и LC-CDR3 переменного домена легкой цепи с SEQ ID NO: 11.

**[0307]** Вариант осуществления 2: Конструкция, связывающая муцин-16 (MUC16), согласно варианту осуществления 1, где компонент антитела содержит: (a) (i) переменную тяжелую (VH) цепь, содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HC-CDR) 1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и (ii) переменную легкую (VL) цепь, содержащую: определяющую комплементарность область легкой цепи (LC-CDR) 1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; или (b) (i) переменную тяжелую (VH) цепь, содержащую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и (ii) переменную легкую (VL) цепь, содержащую: LC-CDR1, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

**[0308]** Вариант осуществления 3: Конструкция, связывающая MUC16, согласно варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, где компонент антитела иммуноспецифически связывается с эктодоменом MUC16.

**[0309]** Вариант осуществления 4: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-3, где компонент антитела представляет собой полноразмерное антитело, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv или одноцепочечный Fv (scFv).

**[0310]** Вариант осуществления 5: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где MUC16 представляет собой человеческий MUC16.

**[0311]** Вариант осуществления 6: конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-5, где VH-цепь и VL-цепь представляют собой человеческие VH-цепь и VL-цепь.

**[0312]** Вариант осуществления 7: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где компонент антитела иммуноспецифически связывается с полипептидом MUC16 c114, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

**[0313]** Вариант осуществления 8: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-6, которая ингибирует инвазию *in vitro* опухолевой клетки, экспрессирующей MUC16, в анализе инвазии в Matrigel.

**[0314]** Вариант осуществления 9: Конструкция, связывающая MUC16, согласно варианту осуществления 8, где опухолевая клетка представляет собой клетку опухоли яичника.

**[0315]** Вариант осуществления 10: Конструкция, связывающая MUC16, согласно варианту осуществления 8 или варианту осуществления 9, где MUC16 является гликозилированным.

**[0316]** Вариант осуществления 11: Конструкция, связывающая MUC16, согласно варианту осуществления 10, где MUC16 является N-гликозилированным по N24 или N30 относительно SEQ ID NO: 25.

- [0317]** Вариант осуществления 12: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-11, где компонент антитела представляет собой моноклональное антитело.
- [0318]** Вариант осуществления 13: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-12, где компонент антитела содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.
- [0319]** Вариант осуществления 14: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-13, где компонент антитела содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.
- [0320]** Вариант осуществления 15: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-12, где компонент антитела содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.
- [0321]** Вариант осуществления 16: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-12 или 15, где компонент антитела содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.
- [0322]** Вариант осуществления 17: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-12, где компонент антитела содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.
- [0323]** Вариант осуществления 18: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-12, где компонент антитела содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.
- [0324]** Вариант осуществления 19: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-18, где компонент антитела содержит константные области тяжелой и легкой цепи, полученные от человека.
- [0325]** Вариант осуществления 20: Конструкция, связывающая MUC16, согласно варианту осуществления 19, где константная область тяжелой цепи имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из гамма-1, гамма-2, гамма-3 и гамма-4.

**[0326]** Вариант осуществления 21: Конструкция, связывающая MUC16, согласно варианту осуществления 19 или 20, где константная область легкой цепи имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из каппа и лямбда.

**[0327]** Вариант осуществления 22: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-21, где компонент антитела представляет собой иммуноглобулин, содержащий две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи.

**[0328]** Вариант осуществления 23: Конструкция, связывающая MUC16, согласно варианту осуществления 22, где иммуноглобулин представляет собой IgG.

**[0329]** Вариант осуществления 24: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-22, которая является моноспецифичной.

**[0330]** Вариант осуществления 25: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-22, которая является мультиспецифичной.

**[0331]** Вариант осуществления 26: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-22, которая является биспецифичной.

**[0332]** Вариант осуществления 27: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-22, которая представляет собой тандемный scFv, диатело (Db), одноцепочечное диатело (scDb), перенацеливающее антитело с двойной аффинностью (DART), F(ab')<sub>2</sub>, антитело с двумя переменными доменами (DVD), антитело типа «выступ-во-впадину» (KiH), антитело типа «замок на причале» («dock-and-lock», DNL), химически сшитое антитело, гетеромультимерное антитело или гетероконъюгатное антитело.

**[0333]** Вариант осуществления 28: Конструкция, связывающая MUC16, согласно варианту осуществления 27, которая представляет собой тандемный scFv, содержащий два scFv, связанные пептидным линкером.

**[0334]** Вариант осуществления 29: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 25-28, где компонент антитела, иммуноспецифически распознающий MUC16, представляет собой первый компонент антитела, и при этом конструкция, связывающая MUC16, дополнительно содержит второй компонент антитела, иммуноспецифически распознающий второй антиген.

- [0335] Вариант осуществления 30: Конструкция, связывающая MUC16, согласно варианту осуществления 29, где второй антиген представляет собой антиген на поверхности Т-клетки.
- [0336] Вариант осуществления 31: Конструкция, связывающая MUC16, согласно варианту осуществления 30, где второй антиген представляет собой CD3.
- [0337] Вариант осуществления 32: Конструкция, связывающая MUC16 согласно варианту осуществления 31, где второй антиген выбран из группы, состоящей из CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  и CD3 $\zeta$ .
- [0338] Вариант осуществления 33: Конструкция, связывающая MUC16, согласно варианту осуществления 32, где второй антиген представляет собой CD3 $\epsilon$ .
- [0339] Вариант осуществления 34: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-19 или 24-26, которая представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).
- [0340] Вариант осуществления 35: Конструкция, связывающая MUC16, согласно варианту осуществления 34, где CAR содержит костимулирующий домен.
- [0341] Вариант осуществления 36: Конструкция, связывающая MUC16, согласно варианту осуществления 34 или 35, где CAR содержит цитоплазматический сигнальный домен дзета ( $\zeta$ )-цепи CD3.
- [0342] Вариант осуществления 37: Конструкция, связывающая MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-36, дополнительно конъюгированная с пептидным агентом, детектирующим агентом, визуализирующим агентом, терапевтическим агентом или цитотоксическим агентом.
- [0343] Вариант осуществления 38: Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность согласно одной или более из SEQ ID NO: 2-17 или аминокислоту конструкции, связывающие MUC16 согласно любому из вариантов осуществления 1-37.
- [0344] Вариант осуществления 39: Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более полипептидов согласно варианту осуществления 38.
- [0345] Вариант осуществления 40: Вектор, содержащий полинуклеотид согласно варианту осуществления 39, функционально связанный с промотором.

- [0346] Вариант осуществления 41: Клетка, содержащая конструкцию, связывающую MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-37, полипептид согласно варианту осуществления 38, полинуклеотид согласно варианту осуществления 39 или вектор согласно варианту осуществления 40.
- [0347] Вариант осуществления 42: Клетка согласно варианту осуществления 41, которая представляет собой клетку млекопитающего.
- [0348] Вариант осуществления 43: Клетка согласно варианту осуществления 42, которая представляет собой иммунную клетку.
- [0349] Вариант осуществления 44: Клетка согласно варианту осуществления 43, которая представляет собой лимфоцит.
- [0350] Вариант осуществления 45: Клетка согласно варианту осуществления 44, которая представляет собой Т-клетку или В-клетку.
- [0351] Вариант осуществления 46: Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество конструкции, связывающие MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-37, полинуклеотида согласно варианту осуществления 39, вектора согласно варианту осуществления 40 или клетки согласно любому из вариантов осуществления 41-45; и фармацевтически приемлемый носитель.
- [0352] Вариант осуществления 47: Способ лечения связанного с MUC16 заболевания или расстройства у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 46.
- [0353] Вариант осуществления 48: Способ согласно варианту осуществления 47, где указанное связанное с MUC16 заболевание или расстройство представляет собой рак.
- [0354] Вариант осуществления 49: Способ согласно варианту осуществления 47, где указанный рак представляет собой рак яичника, легкого, поджелудочной железы, молочной железы, матки, фаллопиевой трубы или первичный рак брюшины.
- [0355] Вариант осуществления 50: Способ согласно варианту осуществления 47 или 48, где указанный рак представляет собой метастатический рак.

**[0356]** Вариант осуществления 51: Способ согласно любому из вариантов осуществления 47-49, где фармацевтическая композиция ингибирует метастазирование у пациента.

**[0357]** Вариант осуществления 52: Способ согласно любому из вариантов осуществления 47-50, где указанный пациент представляет собой человека.

**[0358]** Вариант осуществления 53: Способ получения эффекторной клетки, включающий генетическую модификацию клетки одной или более нуклеиновыми кислотами, кодирующими конструкцию, связывающую MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-37.

**[0359]** Вариант осуществления 54: Способ лечения, включающий введение одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих конструкцию, связывающую MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-37, в одну или более первичных клеток, выделенных от пациента, и введение клеток, содержащих указанные одну или более нуклеиновых кислот, указанному пациенту.

**[0360]** Вариант осуществления 55: Способ согласно варианту осуществления 52, дополнительно включающий размножение клеток до введения клеток пациенту.

**[0361]** Вариант осуществления 56: Способ согласно варианту осуществления 52 или 53, где первичные клетки представляют собой лимфоциты.

**[0362]** Вариант осуществления 57: Способ согласно варианту осуществления 54, где первичные клетки представляют собой Т-клетки.

**[0363]** Вариант осуществления 58: Способ согласно любому из вариантов осуществления 47-55, который дополнительно включает введение пациенту терапевтически эффективного количества дополнительного терапевтического агента.

**[0364]** Вариант осуществления 59: Способ согласно любому из вариантов осуществления 53-58, где конструкция, связывающая MUC16, представляет собой конструкцию, связывающую MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 34-36.

**[0365]** Вариант осуществления 60: Способ обнаружения MUC16 в образце, включающий: (а) приведение образца в контакт с конструкцией, связывающей MUC16 согласно любому из вариантов осуществления 1-24 и 37; и (b) обнаружение

связывания, непосредственное или опосредованное, между конструкцией, связывающей MUC16, и любым MUC16 в образце.

**[0366]** Вариант осуществления 61: Способ согласно варианту осуществления 60, где конструкция, связывающая MUC16, конъюгирована с детектируемой меткой.

**[0367]** Вариант осуществления 62: Способ согласно варианту осуществления 61, где детектируемая метка представляет собой хромогенный, ферментный, радиоизотопный, изотопный, флуоресцентный, токсичный, хемилюминесцентный агент, контрастный агент для ядерного магнитного резонанса.

**[0368]** Вариант осуществления 63: Способ согласно варианту осуществления 61 или 62, где связывание между конструкцией, связывающей MUC16, и любым MUC16 в образце обнаруживают непосредственно путем обнаружения детектируемой метки.

**[0369]** Вариант осуществления 64: Способ согласно варианту осуществления 60, где связывание между конструкцией, связывающей MUC16, и любым MUC16 в образце обнаруживают опосредованно с использованием вторичного антитела.

**[0370]** Вариант осуществления 65: Способ диагностики индивидуума с подозрением на наличие связанного с MUC16 заболевания или расстройства, включающий а) введение эффективного количества конструкции, связывающие MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-24 или 37 указанному индивидууму; и б) определение уровня связывания, непосредственно или опосредованно, между конструкцией, связывающей MUC16, и любым MUC16 у указанного индивидуума, где уровень связывания выше порогового уровня указывает на то, что указанный индивидуум имеет связанное с MUC16 заболевание или расстройство.

**[0371]** Вариант осуществления 66: Способ диагностики индивидуума с подозрением на наличие связанного с MUC16 заболевания или расстройства, включающий а) приведение образца, содержащего клетки, полученные от указанного индивидуума, в контакт с конструкцией, связывающей MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-24 или 37; и б) определение количества клеток в образце, связанных с конструкцией, связывающей MUC16, где значение количества клеток, связанных с конструкцией, связывающей MUC16, выше порогового уровня

свидетельствует о том, что указанный индивидуум имеет связанное с MUC16 заболевание или расстройство.

**[0372]** Вариант осуществления 67: Применение конструкции, связывающие MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-37, полинуклеотида согласно варианту осуществления 39, вектора согласно варианту осуществления 40 или клетки согласно любому из вариантов осуществления 41-45 для лечения заболевания или расстройства, связанного с положительной экспрессией MUC16.

**[0373]** Вариант осуществления 68: Применение конструкции, связывающие MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-37, полинуклеотида согласно варианту осуществления 39, вектора согласно варианту осуществления 40 или клетки согласно любому из вариантов осуществления 41-45 для производства лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с положительной экспрессией MUC16.

**[0374]** Вариант осуществления 69: Применение конструкции, связывающие MUC16, согласно любому из вариантов осуществления 1-37, полинуклеотида согласно варианту осуществления 39, вектора согласно варианту осуществления 40 или клетки согласно любому из вариантов осуществления 41-45 для диагностики заболевания или расстройства, связанного с положительной экспрессией MUC16.

**[0375]** Вариант осуществления 70: Применение согласно любому из вариантов осуществления 62-64, где заболевание или расстройство, связанное с положительной экспрессией MUC16, представляет собой рак.

**[0376]** Настоящее изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, описанными в данной заявке, которые приведены исключительно в качестве иллюстрации отдельных аспектов изобретения. Все различные варианты осуществления настоящего изобретения не будут описаны в настоящем документе. В рамках объема и сущности изобретения возможны многие его модификации и вариации, как будет очевидно специалистам в данной области техники. Функционально эквивалентные способы и устройства в пределах объема изобретения, помимо перечисленных в настоящей заявке, будут понятны специалистам в данной области техники из приведенных выше описаний. Подразумевается, что такие модификации и вариации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Настоящее изобретение должно быть ограничено только прилагаемой формулой изобретения наряду с полным объемом эквивалентов, которые имеют место для указанной формулы изобретения.

**[0377]** Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными применениями, способами, реагентами, соединениями, композициями или биологическими системами, которые, безусловно, могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, приведена исключительно в целях описания конкретных вариантов осуществления и не имеет ограничительного характера.

**[0378]** Кроме того, когда признаки или аспекты изобретения описаны посредством формул Маркуша, специалисту в данной области будет ясно, что изобретение, таким образом, также описано посредством любого отдельного члена или подгруппы членов формулы Маркуша.

**[0379]** Как будет ясно специалисту в данной области техники, при любых обстоятельствах, в частности, при приведении письменного описания, все диапазоны, раскрытые в настоящем документе, также включают все возможные поддиапазоны и комбинации поддиапазонов. Любой перечисленный диапазон может быть признан достаточным образом описывающим и обеспечивающим тот же диапазон, разбитый по меньшей мере на равные половины, трети, четверти, пятые, десятые части и т. д. В качестве неограничивающего примера, каждый диапазон, обсуждаемый в настоящем документе, может быть легко разбит на нижнюю треть, среднюю треть и верхнюю треть, и т. д. Специалисту в данной области техники также будет ясно, что все формулировки, такие как «вплоть до», «по меньшей мере», «более чем», «менее чем» и т. д., включают указанное число и относятся к диапазонам, которые могут быть дополнительно разбиты на поддиапазоны, как обсуждается выше. Наконец, как будет ясно специалисту в данной области техники, диапазон включает каждый индивидуальный член. Таким образом, например, группа, содержащая 1-3 клетки, относится к группам, содержащим 1, 2 или 3 клетки. Аналогичным образом, группа, содержащая 1-5 клеток, относится к группам, содержащим 1, 2, 3, 4 или 5 клеток, и т. д.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Конструкция, связывающая муцин-16 (MUC16), содержащая компонент антитела, иммуноспецифически распознающий полипептид муцина-16 (MUC16), где указанный компонент антитела содержит:

(a) (i) вариабельную тяжелую (VH) цепь, содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HC-CDR) 1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариабельного домена тяжелой цепи с SEQ ID NO: 2; и

(ii) вариабельную легкую (VL) цепь, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (LC-CDR) 1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариабельного домена легкой цепи с SEQ ID NO: 3;

или

(b) (i) вариабельную тяжелую (VH) цепь, содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HC-CDR) 1, HC-CDR2 и HC-CDR3 вариабельного домена тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10; и

(ii) вариабельную легкую (VL) цепь, содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (LC-CDR) 1, LC-CDR2 и LC-CDR3 вариабельного домена легкой цепи с SEQ ID NO: 11.

2. Конструкция, связывающая MUC16, по п. 1, где указанный компонент антитела содержит:

(a) (i) вариабельную тяжелую (VH) цепь, содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HC-CDR) 1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и

(ii) переменную легкую (VL) цепь, содержащую: определяющую комплементарность область легкой цепи (LC-CDR) 1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

или

(b) (i) переменную тяжелую (VH) цепь, содержащую HC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; HC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и HC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и

(ii) переменную легкую (VL) цепь, содержащую: LC-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; LC-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; и LC-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

3. Конструкция, связывающая MUC16, по п. 1 или п. 2, где указанный компонент антитела иммуноспецифически связывается с эктодоменом MUC16.

4. Конструкция, связывающая MUC16, по любому из пп. 1-3, где указанный компонент антитела представляет собой полноразмерное антитело, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv или одноцепочечный Fv (scFv).

5. Конструкция, связывающая MUC16, по любому из пп. 1-4, где VH-цепь представляет собой человеческую VH-цепь и/или VL-цепь представляет собой человеческую VL-цепь.

6. Конструкция, связывающая MUC16, по любому из пп. 1-5, где указанный компонент антитела представляет собой моноклональное антитело.

7. Конструкция, связывающая MUC16, по любому из пп. 1-6, где указанный компонент антитела содержит: (a) VH, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 2, и/или VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; или (b) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и/или VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

8. Конструкция, связывающая MUC16, по любому из пп. 1-7, где указанный компонент антитела содержит константные области тяжелой и легкой цепи, полученные от человека.

9. Конструкция, связывающая MUC16, по любому из пп. 1-8, где указанный компонент антитела представляет собой иммуноглобулин, содержащий две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи.

10. Конструкция, связывающая MUC16, по п. 9, где иммуноглобулин представляет собой IgG.

11. Конструкция, связывающая MUC16, по любому из пп. 1-10, которая является моноспецифичной, биспецифичной или мультиспецифичной.

12. Конструкция, связывающая MUC16, по любому из пп. 1-11, которая представляет собой тандемный scFv, диатело (Db), одноцепочечное диатело (scDb), перенацеливающее антитело с двойной аффинностью (DART), F(ab')<sub>2</sub>, антитело с двумя переменными доменами (DVD), антитело типа «выступ-во-впадину» (KiH), антитело типа «замок на причале» («dock-and-lock», DNL), химически сшитое антитело, гетеромультимерное антитело или гетероконъюгатное антитело.

13. Конструкция, связывающая MUC16, по п. 11 или п. 12, где компонент антитела, иммуноспецифически распознающий MUC16, представляет собой первый компонент антитела, и при этом конструкция, связывающая MUC16 дополнительно содержит второй компонент антитела, иммуноспецифически распознающий второй антиген.

14. Конструкция, связывающая MUC16, по п. 13, где второй антиген представляет собой антиген CD3.

15. Конструкция, связывающая MUC16, по любому из пп. 1-8 или 11, которая представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

16. Конструкция, связывающая MUC16, по любому из пп. 1-15, дополнительно конъюгированная с пептидным агентом, детектирующим агентом, визуализирующим агентом, терапевтическим агентом или цитотоксическим агентом.

17. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность согласно одной или более из SEQ ID NO: 2-17 или аминокислоту конструкции, связывающей MUC16, по любому из пп. 1-16.

18. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более полипептидов по п. 17.

19. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 18, функционально связанный с промотором.

20. Клетка, содержащая конструкцию, связывающую MUC16, по любому из пп. 1-16, полипептид по п. 17, полинуклеотид по п. 18 или вектор по п. 19.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество конструкции, связывающей MUC16, по любому из пп. 1-16, полипептида по п. 17, полинуклеотида по п. 18 или вектора по п. 19; и фармацевтически приемлемый носитель.

22. Способ лечения связанного с MUC16 заболевания или расстройства у нуждающегося в этом пациента, включающие введение указанному пациенту фармацевтической композиции по п. 21.

23. Способ по п. 22, где указанное связанное с MUC16 заболевание или расстройство представляет собой рак.

24. Способ по п. 22, где указанный рак представляет собой рак яичника, легкого, поджелудочной железы, молочной железы, матки, фаллопиевой трубы или первичный рак брюшины.

25. Способ получения эффекторной клетки, включающий генетическую модификацию клетки одной или более нуклеиновыми кислотами, кодирующими конструкцию связывающую MUC16, по любому из пп. 1-16.

26. Способ лечения, включающий введение одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих конструкцию связывающую MUC16, по любому из пп. 1-16, в одну или более первичных клеток, выделенных от пациента, и введение клеток, содержащих указанные одну или более нуклеиновых кислот, указанному пациенту.

27. Способ по п. 26, где первичные клетки представляют собой Т-клетки.

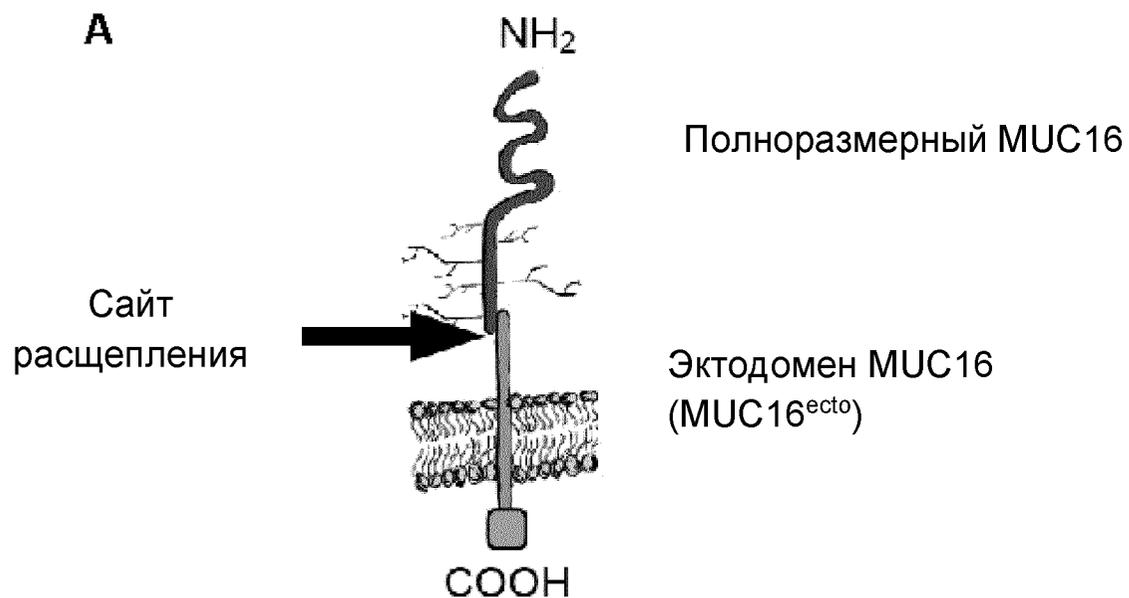
28. Способ обнаружения MUC16 в образце, включающий: (а) приведение образца в контакт с конструкцией, связывающей MUC16, по любому из пп. 1-11 или 16; и (б) обнаружение связывания, непосредственное или опосредованное, между конструкцией, связывающей MUC16 и любым MUC16 в образце.

29. Способ диагностики индивидуума с подозрением на наличие связанного с MUC16 заболевания или расстройства, включающий:

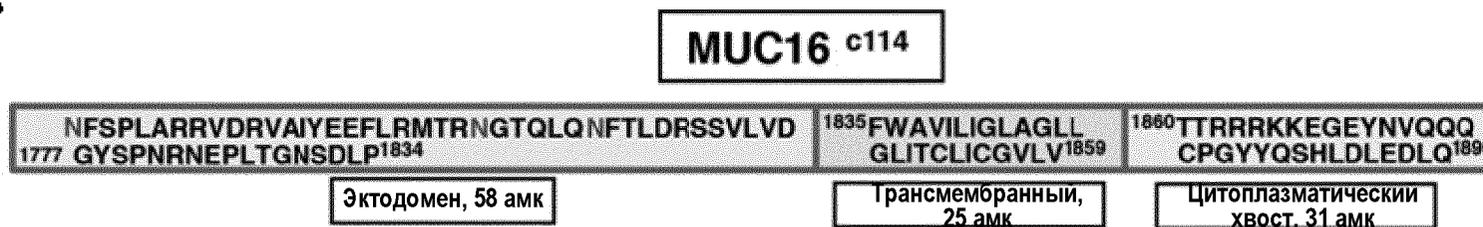
а) введение эффективного количества конструкции, связывающей MUC16, по любому из пп. 1-11 или 16 указанному индивидууму; и определение уровня связывания, непосредственно или опосредованно, между конструкцией, связывающей MUC16 и любым MUC16 у указанного индивидуума, где уровень связывания выше порогового уровня указывает на то, что указанный индивидуум имеет связанное с MUC16 заболевание или расстройство; или

(б) приведение образца, содержащего клетки, полученные от указанного индивидуума, в контакт с конструкцией, связывающей MUC16, по любому из пп. 1-11 или 16; и определение количества клеток в образце, связанных с конструкцией, связывающей MUC16, где значение количества клеток, связанных с конструкцией, связывающей MUC16, выше порогового уровня свидетельствует о том, что указанный индивидуум имеет связанное с MUC16 заболевание или расстройство.

30. Применение конструкции, связывающей MUC16, по любому из пп. 1-16, полипептида по п. 17, полинуклеотида по п. 18 или вектора по п. 19, или клетки по п. 20 для лечения заболевания или расстройства, связанного с положительной экспрессией MUC16, для производства лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с положительной экспрессией MUC16, или для диагностики заболевания или расстройства, связанного с положительной экспрессией MUC16.



**B**



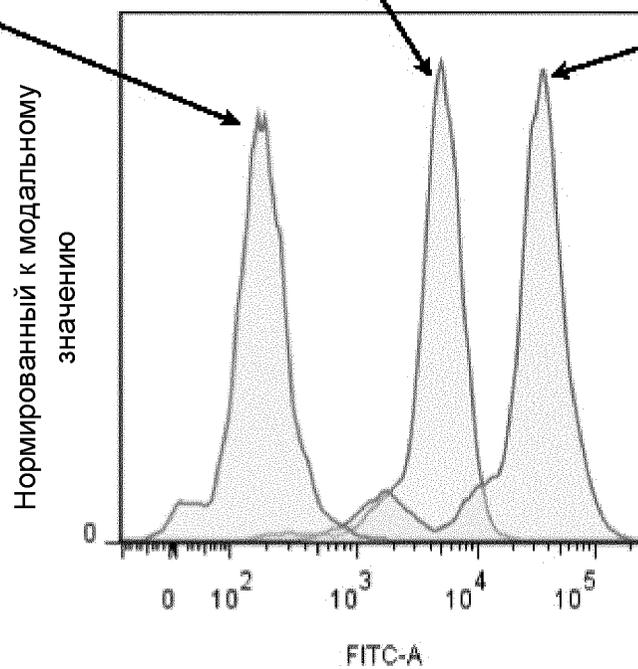
Фиг. 1

		Область 1					
		1	10	20	30	40	55
Трансляция MUC16с114	(1)	NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFILDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNS					
Трансляция N3mutMUC16с114	(1)	NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQAFTILDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNS					
Консенсусная	(1)	NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQ FTILDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNS					
		Область 2					
		56	70	80	90	100	110
Трансляция MUC16с114	(56)	DLPPWAVILIGLAGLLGVITCLICGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQCPGYYSHLDL					
Трансляция N3mutMUC16с114	(56)	DLPPWAVILIGLAGLLGVITCLICGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQCPGYYSHLDL					
Консенсусная	(56)	DLPPWAVILIGLAGLLGVITCLICGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQCPGYYSHLDL					
		Область 3					
Трансляция MUC16с114	(111)	EDLQ					
Трансляция N3mutMUC16с114	(111)	EDLQ					
Консенсусная	(111)	EDLQ					

Фиг. 2

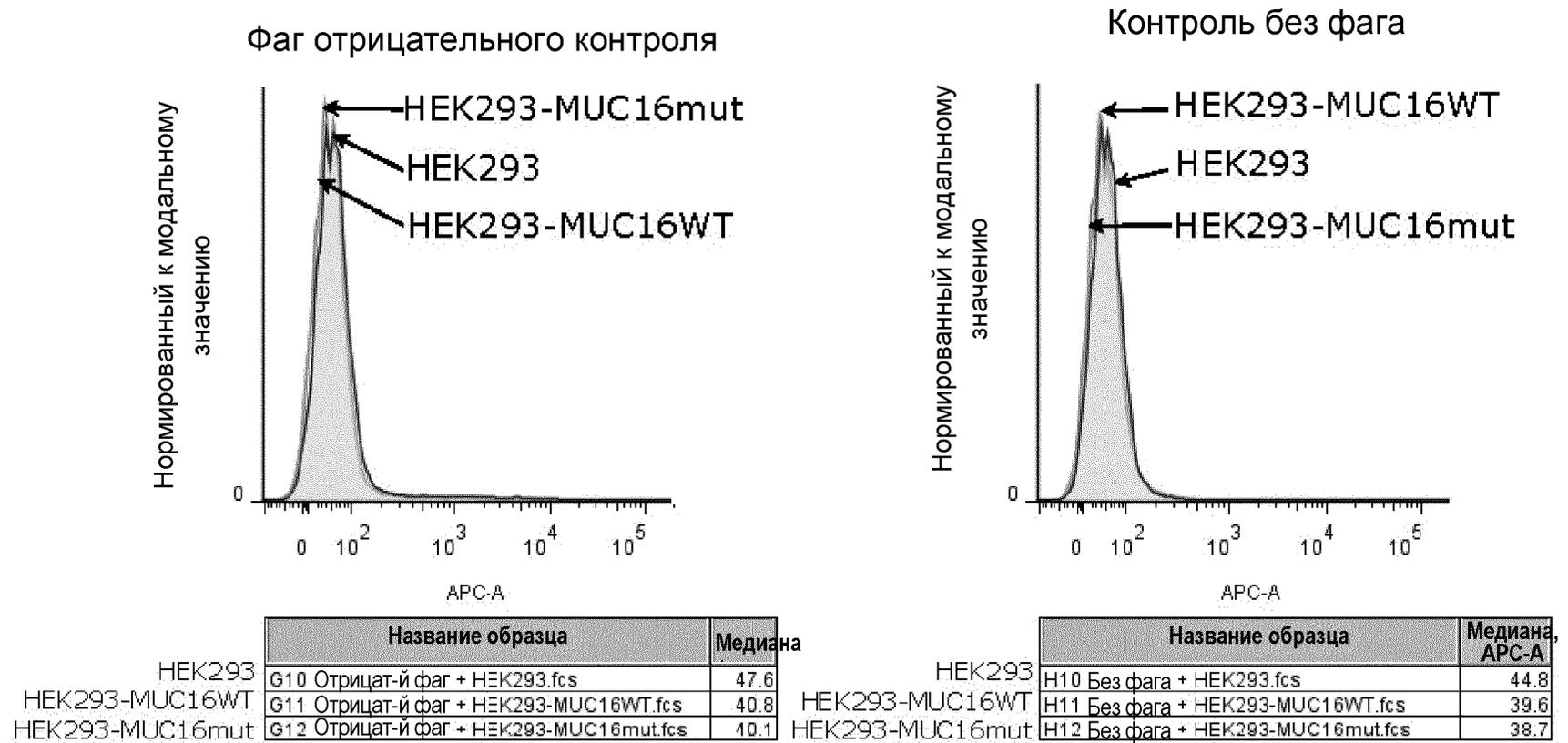
### Экспрессия GFP

HEK293      HEK293-MUC16mut      HEK293-MUC16WT

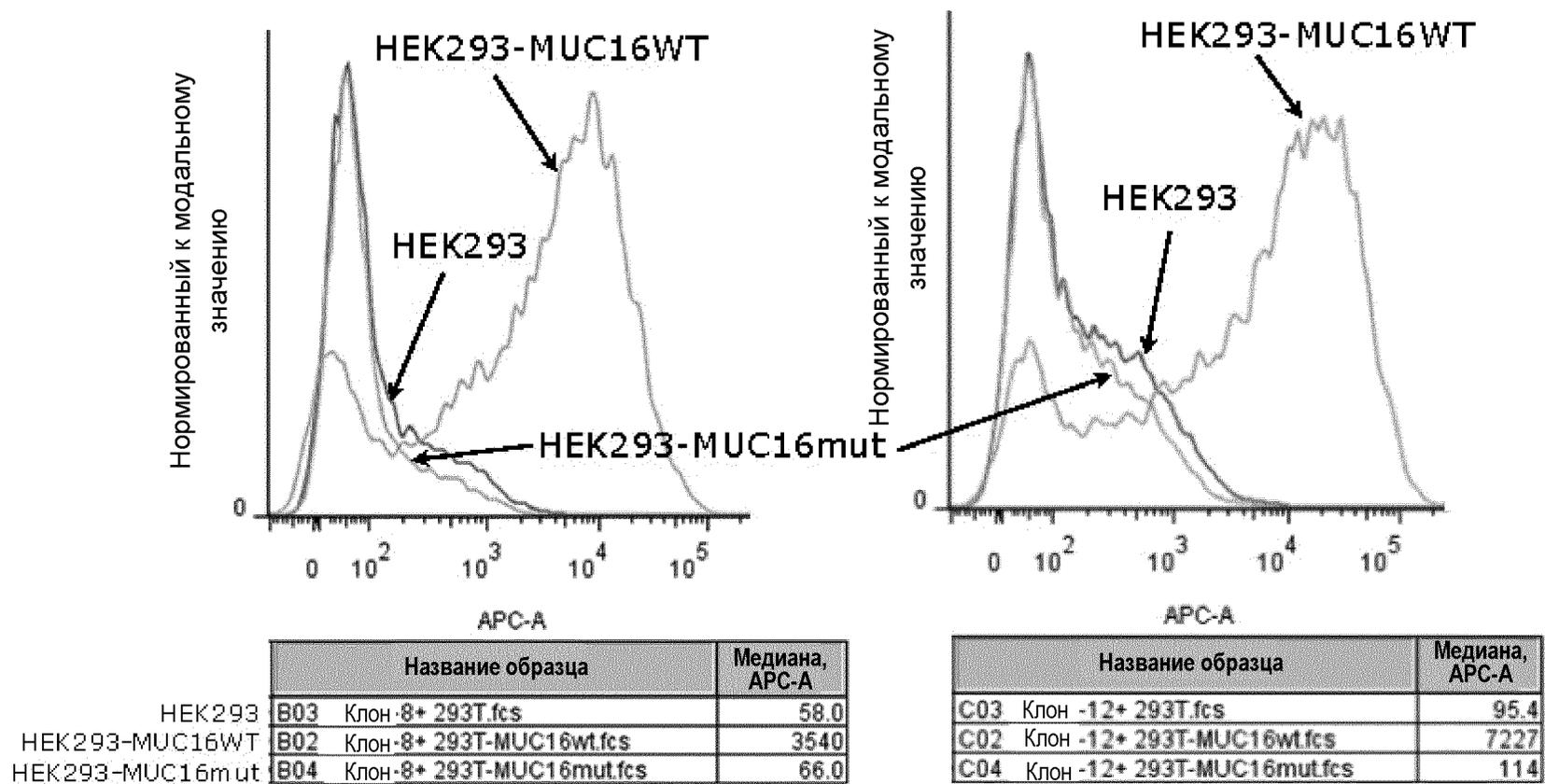


	Название образца	Медиана, FITC-A
HEK293	HEK293.fcs	175
HEK293-MUC16WT	HEK293-MUC16WT.fcs	3.01E4
HEK293-MUC16mut	HEK293-MUC16mut.fcs	4592

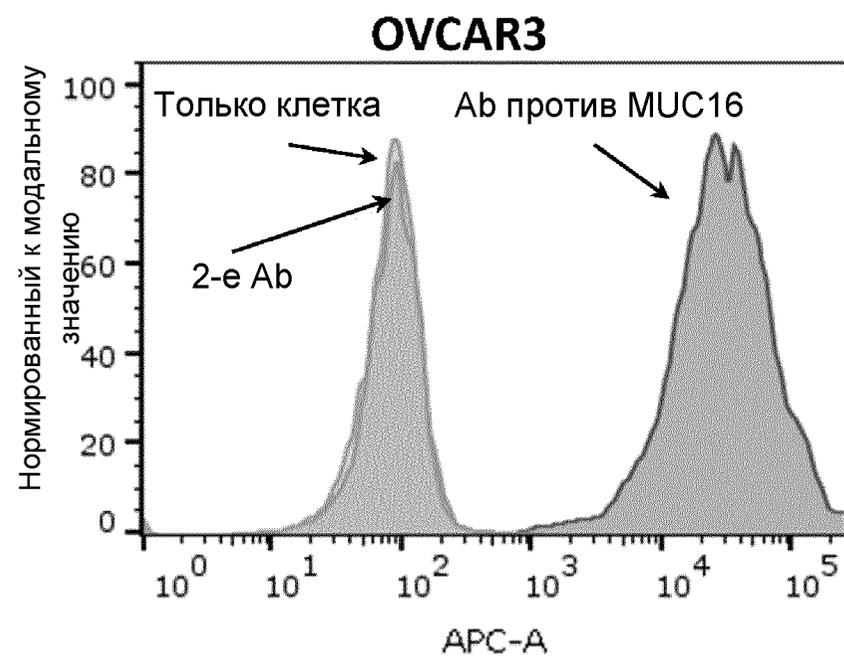
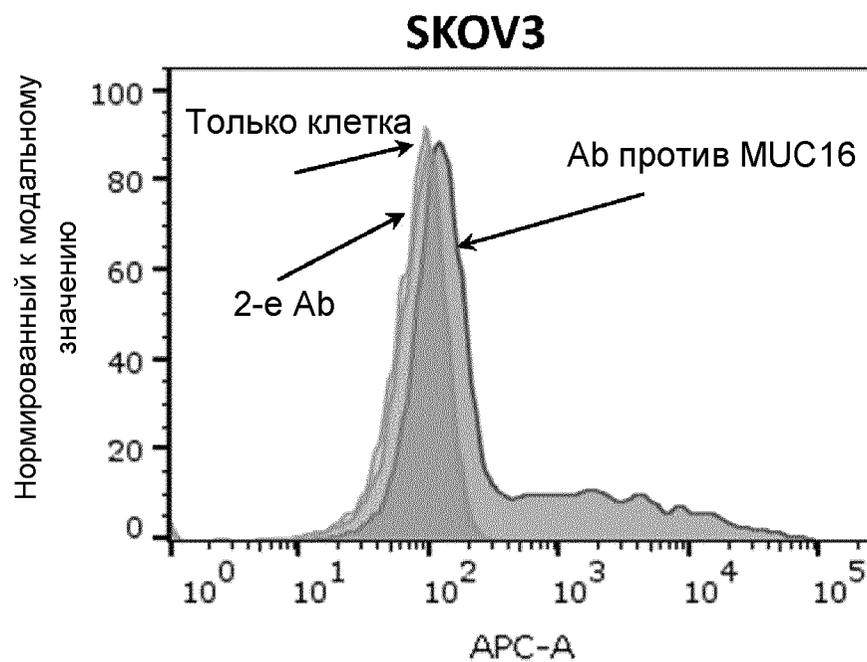
Фиг. 3



Фиг. 4



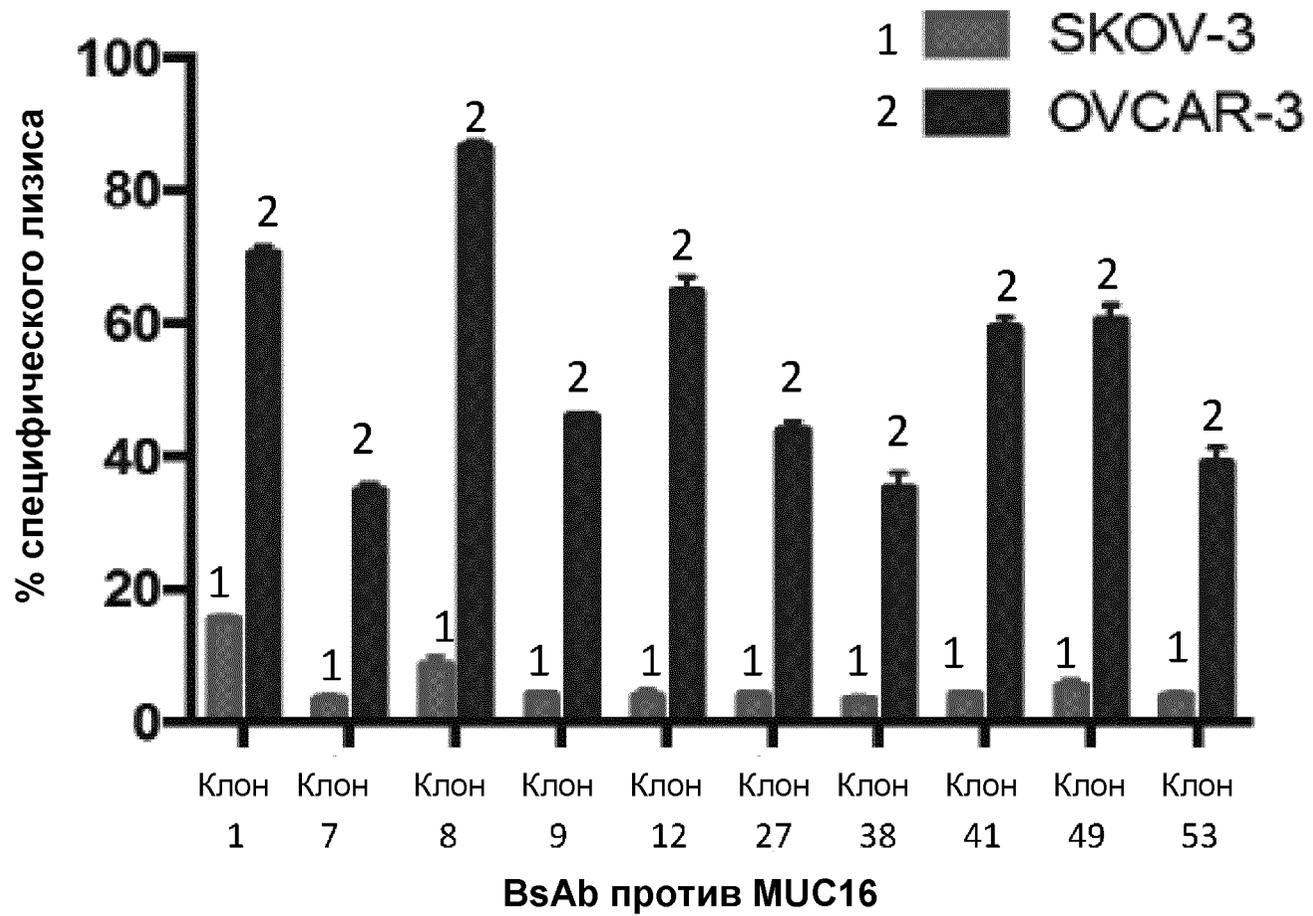
Фиг. 5



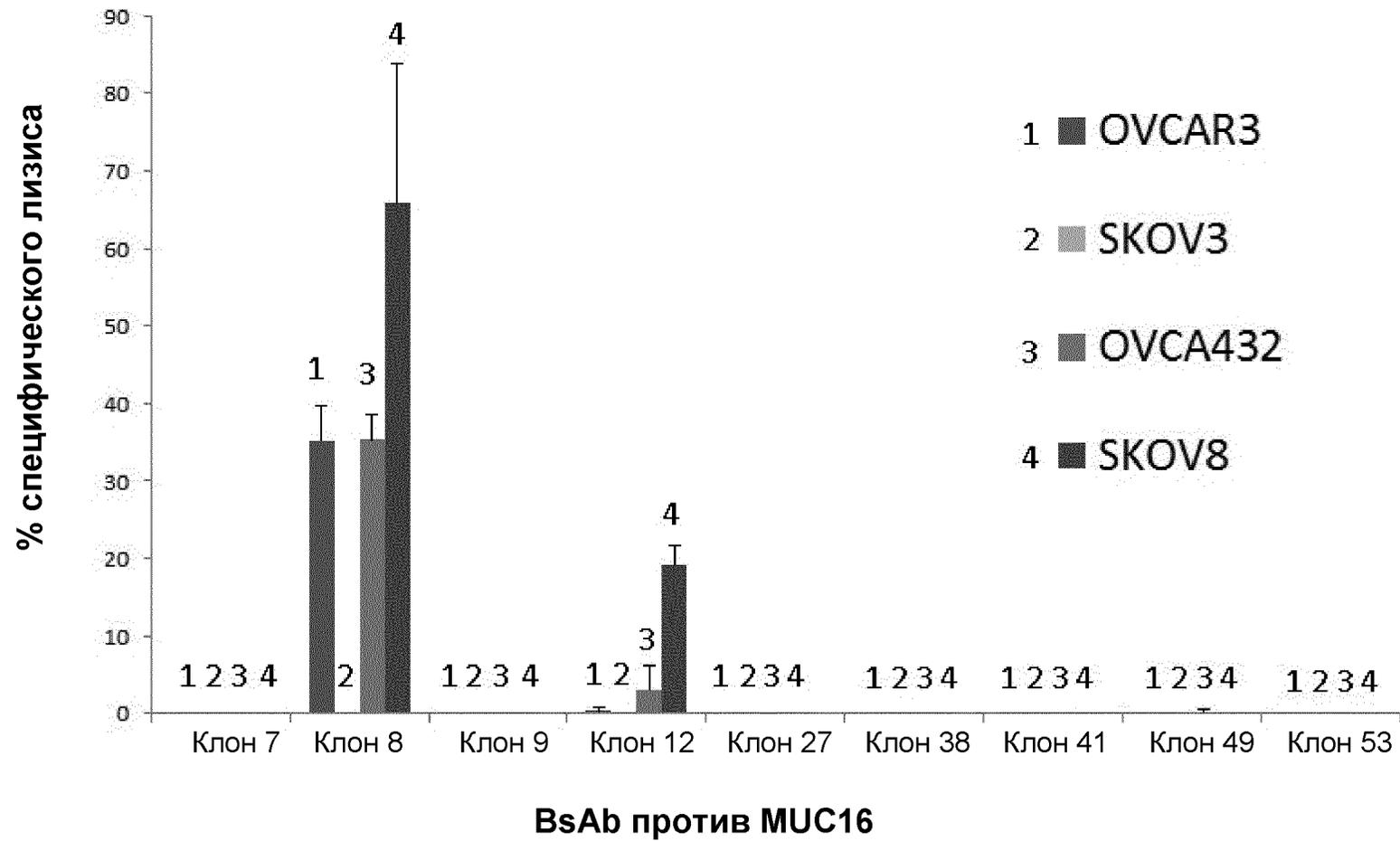
	Название образца	Медиана: APC-A
– Только клетка	OVCAR3_D3_D03_015.fcs	82.6
– 2-е Ab	OVCAR3_G3_G03_027.fcs	88.8
— Ab против MUC16	OVCAR3_F3_F03_023.fcs	149

	Название образца	Медиана: APC-A
	OVCAR3_D4_D04_016.fcs	84.9
	OVCAR3_G4_G04_028.fcs	87.5
	OVCAR3_F4_F04_024.fcs	28368

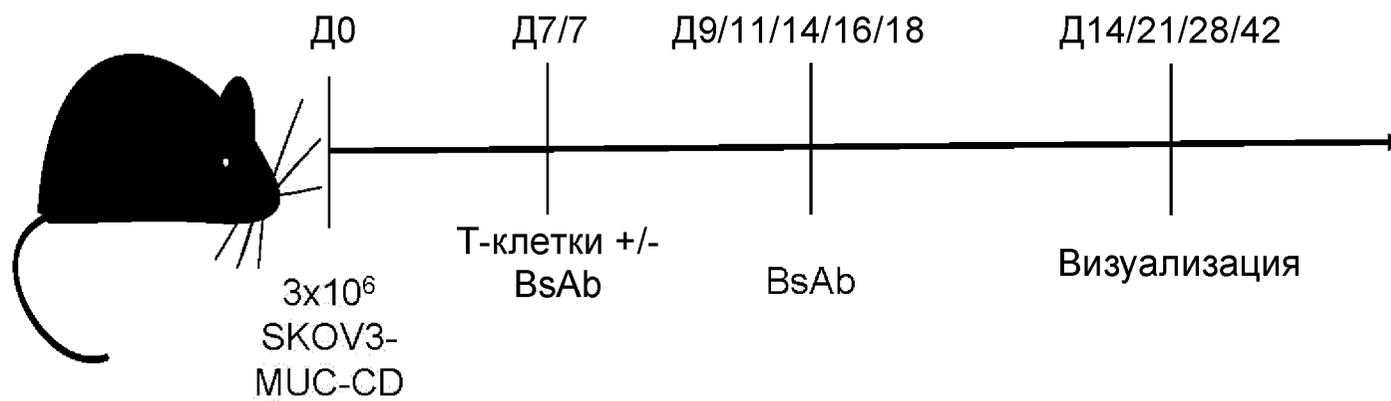
Фиг. 6



Фиг. 7



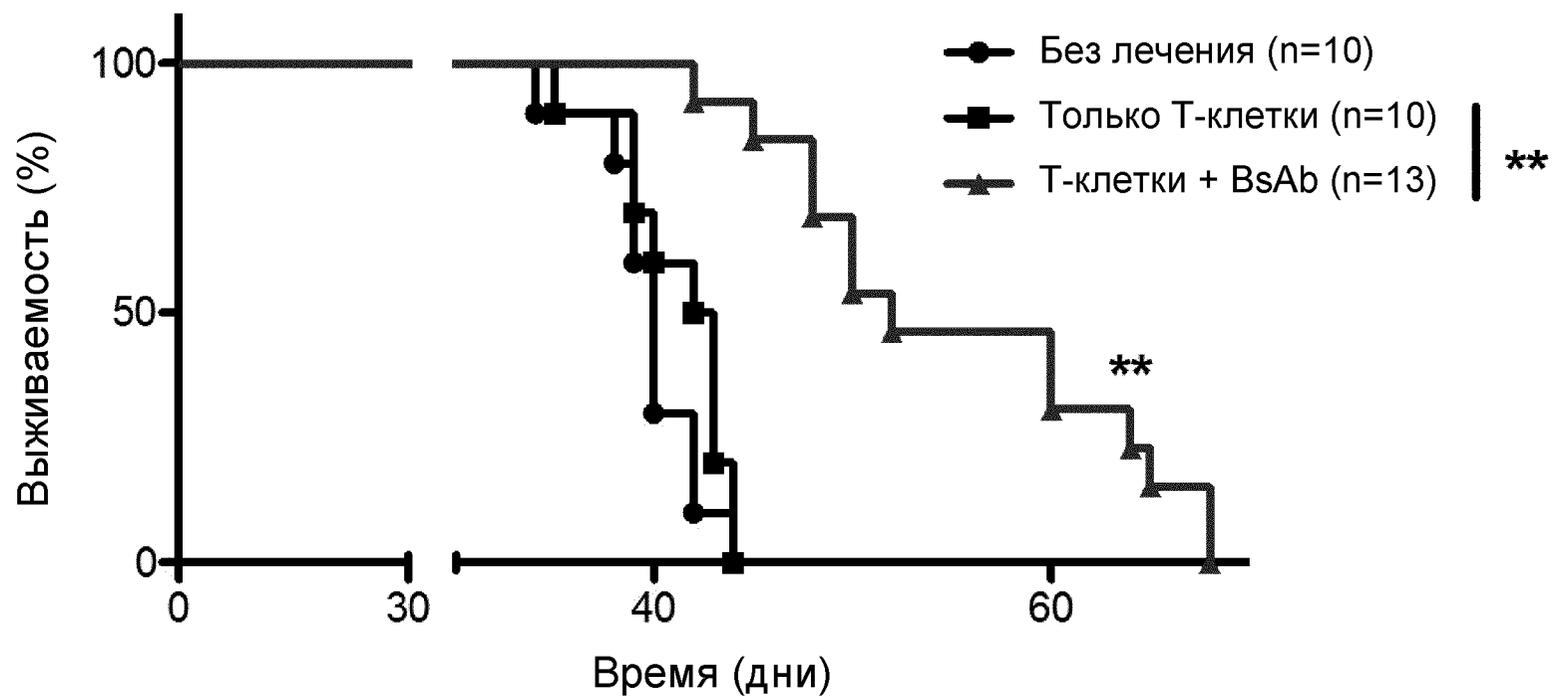
Фиг. 8



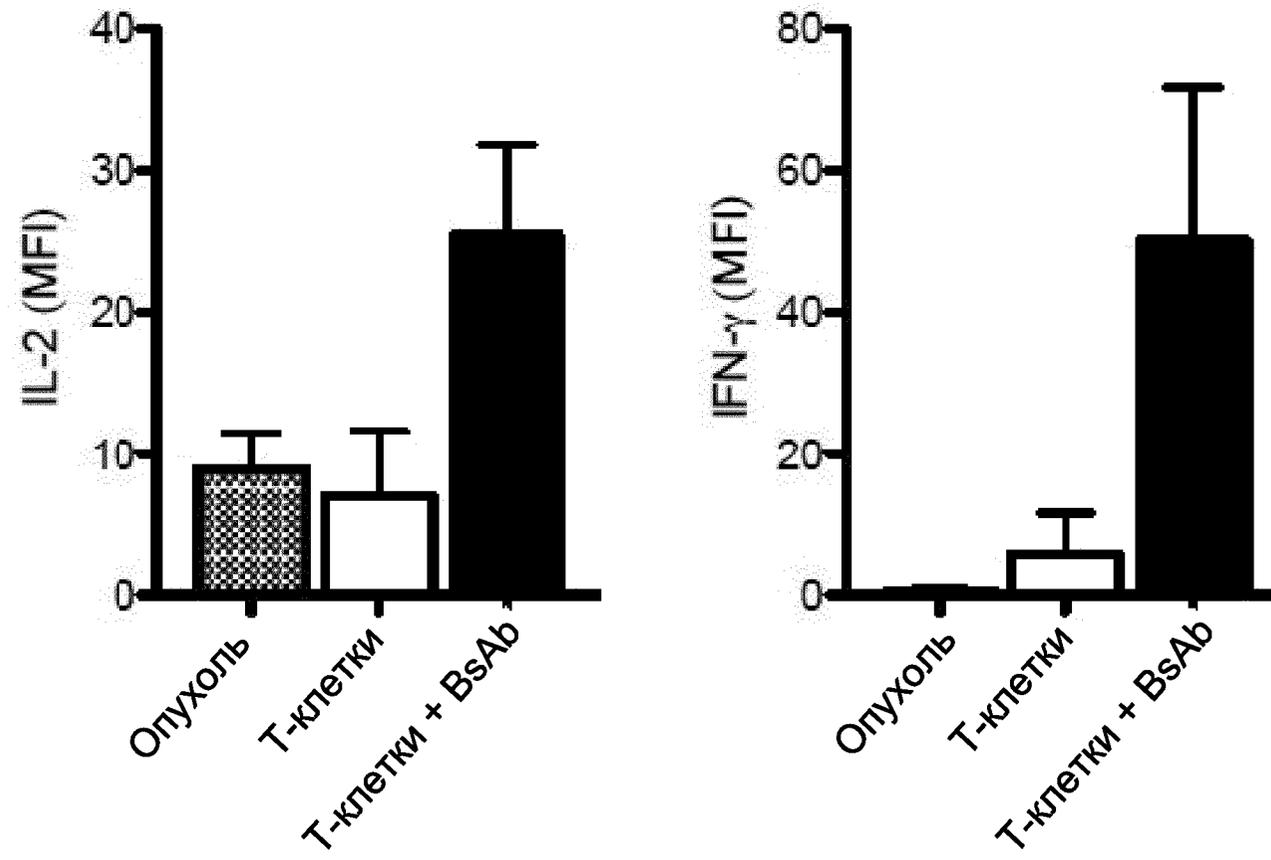
Фиг. 9А



11/12



Фиг. 9С



Фиг. 9D